Untersuchungen zur Charakterisierung eines marinen, parasitischen Phycomyceten

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HARALD SAUTTER
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LINCOLN
ENG.

Untersuchungen zur Charakterisierung eines marinen, parasitischen Phycomyceten

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
HARALD SAUTTER
aus Stuttgart

1983

Tag der mündlichen Prüfung	24.10.1983
Dekan	Professor Dr. E. Kulzer
1. Berichterstatter	Professor Dr. A. Hager
2. Berichterstatter	Professor Dr. B. Schwemmle

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Ilse und meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Hager am Institut für Biologie I, Lehrbereich Allgemeine Botanik, der Universität Tübingen durchgeführt. Für die Überlassung des Themas, Anregungen und großzügige Förderung danke ich Herrn Prof. Dr. A. Hager.
Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. F. Oberwinkler und seiner Arbeitsgruppe, die in uneigennütziger Weise ihre REM- und TEM-Geräte zur Verfügung stellten.
Für ihren Einsatz bei photographischen Problemen danke ich Frau B. Thumm und Frau C. Karl.
Danken darf ich an dieser Stelle allen Freunden und Kollegen, die durch anregende Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem väterlichen Freund und akademischen Lehrer Herrn Dr. Klaus Drumm, der mir stets in fachlicher und menschlicher Hinsicht zur Seite stand. Seine Impulse und Fragestellungen sind wesentlicher Bestandteil meiner wissenschaftlichen Studien.

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Versuchsobjekte	4
2.2.	Abkürzungen und Chemikalien (Bezugsquellen)	6
2.3.	Kulturbedingungen für die *Präsiola* - Klone und *Phycomyceten* - Kulturen	8
2.4.	Methoden zur Bestimmung der Wachstumsraten	13
2.5.	*Prasiola* - S - Homogenat	16
2.6.	Zusammensetzung der Kulturmedien	17
2.7.	Vitalitätstest mit Oxaminblau 4 R	19
2.8.	REM - Präparation	2o
2.8.1.	Fixierung	2o
2.8.2.	Stabilisierung der Exzidate	21
2.9.	TEM - Präparation	22
2.9.1.	Fixierung	22
2.9.2.	Dehydratisierung u. Kontrastierung	24
2.9.3.	DEO - VCD - Polyaddukt-Einbettung	25
2.9.4.	Einbettungsmedien	27
2.9.5.	Schnittkontrastierung mit Chromylchlorid	27
2.1o.	Freeze - etching und Replica (Nomenklatur)	28
2.11.	Reinigung der Chitinase	3o
2.12.	ABTS - ß - D - Glucose- Nachweis	31
2.13.	DMAB - NAG - Nachweis	33
3.	ERGEBNISSE	36
3.1.	Isolierung und Kultur des *Phycomyceten*	36

3.2.	WGA - Au (I u. II) - Markierung	4o
3.3.	WGA - markierte 3 - d - Stadien	41
3.4.	Zellwandfragmentation	42
3.5.	Rekonstruktion der Zellwand	45
3.6.	Aufbau der Chitin - Mikrofibrillen im Entwicklungszyklus des *Phycomyceten*	49
3.7.	Metamorphose und Entwicklungszyklus des *Phycomyceten*	51
3.8.	Reinfektion der axenischen *Prasiola* - Kulturen	57
4.	DISKUSSION	62
4.1.	Isolierung und präparative Verfahren	62
4.2.	Klassifizierung und systematische Stellung des *Phycomyceten*	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG	66
6.	LITERATURVERZEICHNIS	69

1. EINLEITUNG

Eine bessere Charakterisierung mariner *Phycomyceten* ist neuerdings durch die Verfeinerung biochemischer Nachweismethoden und die Möglichkeiten , die das Transmissions- und Rasterelektronenmikroskop bietet, möglich geworden. In der Vergangenheit hat die Zuordnung und Deutung von meist einzelligen, hyalinen Gebilden in Klonkulturen von marinen Grünalgen häufig Schwierigkeiten bereitet. So wurden sie in Unkenntnis der karyologischen und cytologischen Verhältnisse u. a. als Fortpflanzungsorgane von Grünalgen gedeutet. In der rein descriptiven Darstellung dieser Gebilde war der Gedanke, daß es sich um parasitische Organismen handeln könnte, nicht erörtert worden.
So beschreiben CHADEFAUD et EMBERGER (1960) auf der marinen Chlorophycee *Prasiola stipitata* SUHR unilokuläre, hyaline Sporangien bzw. Sporocysten, in denen mehrere zweigeißelige, opisthokonte Schwärmer (Zoosporen oder Planogameten ?) entstehen. CHAPMAN (1968), der auf die Arbeiten von FRIEDMANN (1959) Bezug nimmt, kennzeichnet diese hyalinen Bildungen als periphere Zellen des diploiden Thallus, die zweigeißelige Schwärmer unterschiedlicher Größe entlassen, wobei der weibliche Gamet vor der Zygotenbildung eine Geißel verliert und sich zu einem Gameten mit opisthokont - uniflagellater Begeißelung reduziert. Dieses für die Grünalgen unwahrscheinliche Phänomen, daß heteromorphe Gameten sich unter Geißelverlust weiter differenzieren sollen und die Folgearbeiten von FRIEDMANN (1960) und KORNMANN (1974/77), die den tatsächlichen sexuellen Zyklus von *Prasiola* beschreiben, ohne die früheren Befunde von FRIEDMANN (1959) zu korrigieren und die erklärten Phänomene zu untersuchen, waren erste Ansatzpunkte für eigene Klonierversuche.
Bei allen Kulturen von *Prasiola stipitata* traten in unterschiedlichsten Entwicklungsstadien hyaline Zellen

auf, die regellos auf der Zelloberfläche des Thallus inseriert sind. Da diese Zellen keineswegs mit der Fertilität der Grünalge gekoppelt waren und sogar im frühesten Zweizellstadium auftraten, konnte eine Interpretation nach CHAPMAN (1968) primär ausgeschlossen werden. Vielmehr war aufgrund des epidemischen Auftretens in allen Klonen und der erfolgreichen Isolation in axenischen Algenkulturen der Nachweis gelungen (SAUTTER (1980)), daß *Prasiola stipitata* SUHR keine dem Thallus aufsitzende Gametangien bildet.
Wie die folgende Untersuchung zeigen wird, handelt es sich im Falle der hyalinen Zelle um einen *Phycomyceten*, der in allen submersen *Prasiola* - Kulturen wiederzufinden ist.
Ungeklärt blieb bislang, ob durch den Befall der Alge Physiologie und Habitus verändert werden, bzw. ob im Entwicklungszyklus des *Phycomyceten* intrazelluläre Stadien auftreten oder Rhizoide in die Thalluszelle der infizierten Alge eindringen.
In der vorliegenden Untersuchung wird nun eine genaue Charakterisierung und Klassifizierung des *Phycomyceten* vorgelegt.
Die unzureichenden Kenntnisse über die marinen *Phycomyceten* und die großen präparativen Schwierigkeiten bei der Untersuchung dieses einzelligen Vertreters erfordern einerseits neue Isolierungstechniken und andererseits neue präparative Verfahren in der biochemischen Nachweisführung und elektronenmikroskopischen Aufbereitung der markierten Materialien.
So mußten die standardisierten Einbettungsverfahren und Kontrastierungen neu überarbeitet und dem osmostabilen Organismus angepaßt werden. Der biochemische Nachweis von Chitin als Zellwandsubstanz, als signifikantes Merkmal des *Phycomyceten* und somit eindeutiger Beweis für die Individualität und Identität des parasitierenden *Phycomyceten* ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

HORISBERGER et VONLANTHEN (1977) versuchten an Dünn-

schnitten von Hefezellen mit Au - marker Chitin nachzuweisen, wobei es ihnen wie in den Folgearbeiten von MOLANO et al (1980) und VIAN (1981) nicht gelang, die sehr schwachen Markierungen an Totalpräparaten durchzuführen, ohne im intrazellulären Bereich ebenfalls Markierungen auszuschließen.
Offen bleibt, ob auch glycosyliertes Ferritin und WGA (Wheat Germ Agglutinin) tatsächlich an Chitinfibrillen angelagert werden (VIAN 1981), oder ob eine graduelle Affinität entlang der architektonischen Zellwandstrukturen besteht.
Hingegen wird in dieser Arbeit versucht, durch enzymatische Hydrolyse mit NAGase (Chitinase) und Chitobiase in Perfusion eine eindeutige WGA - Au - Komplexbildung mit dem Monomer NAG im elektronenmikroskopischen Präparat sichtbar zu machen.
Schließlich soll mit Fragmentationen und Zell - "ghost" - Präparationen ein erster Einblick in den Zellwandaufbau des *Phycomyceten* gewonnen werden, wodurch die bislang rein deskriptiven Betrachtungen konkretisiert und experimentell gesichert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsobjekte

Versuchsobjekte waren nichtaxenische Kulturen eines Klons von *Prasiola stipitata* aus dem Supralitoral von Helgoland (Nordmole), die erstmalig 1968 von Herrn Dr. K. Drumm in Tübingen angelegt wurden. Ergänzt durch eigene Probenahmen im Jahre 1979 und 198o, konnten sowohl ständig submers gehaltene Kulturen, als auch Frischmaterial untersucht werden.
Wie aus Abb. 1 hervorgeht, kann der Lebenszyklus von *Prasiola stipitata* als stark heteromorph diplohaplont angesehen werden.

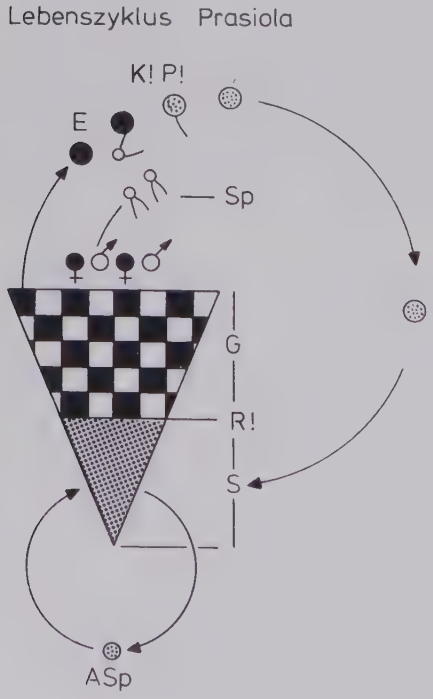


Abb. 1 Lebenszyklus *Prasiola stipitata* nach FRIEDMANN (1969) verändert.

Es liegt Oogamie vor. Die männlichen und weiblichen Gametophyten bleiben nach der Meiose Bestandteil des Sporophyten. Der vegetative Thallus ist diploid und vermehrt sich ungeschlechtlich durch diploide Aplano - sporen. Die sexuelle Phase wird durch Meiose in den apikalen Zellen des Thallus eingeleitet. Einige weitere mitotische Teilungen liefern einen haploiden Bezirk aus mosaikartig angeordneten Feldern heller männlicher und dunkler weiblicher Gametangien. Die männlichen Gameten sind zweigeißelige, isokonte Spermatozoiden, während die weiblichen Gameten unbewegliche Eizellen darstellen. Nach KORNMANN et SAHLING (1977) erhält *Prasiola stipitata* eine eigene Ordnung *Prasiolales* in der Klasse *Chloro - phyceae*.
Aus den angelegten *Prasiola*-Kulturen konnte ein ekto - biotischer, hyaliner *Phycomycet* isoliert werden, der nach Abb. 2 regellos auf dem gesamten Thallus verteilt war.

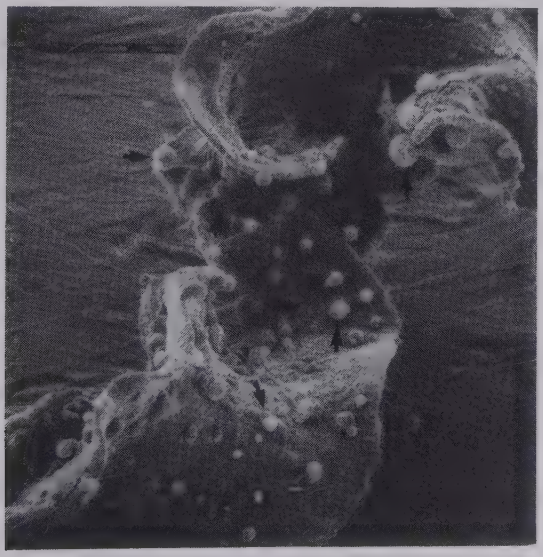


Abb. 2 *Prasiola*-Thallus mit ektobiotischem *Phycomycet*. Raster 1oo µm.

Durch die Entwicklung eines geeigneten Nährmediums konnte der *Phycomycet* bislang über 12o Tage kultiviert werden. Für rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen wurde jedoch auf unmittelbar klonierte Zell-Linien zurückgegriffen, da die Vitalität der Kulturen über den genannten Zeitraum stark absank.

2.2. Abkürzungen und Chemikalien (Bezugsquellen)

Für alle präparativen Verfahren wurden ausnahmslos analysenreine Chemikalien verwendet. Da eine Auflistung aller eingebrachten Chemikalien und laborüblichen Lösungen und Verdünnungen zu umfangreich wäre, wurden ausschließlich Chemikalien und deren Kurzform angeführt, die in Versuchsreihen getestet bzw. die besonderen experimentellen Bedingungen garantierten.

ABTS 2,2'-Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonat -(6)), Boehringer
Amberlyst A 26, Serva
Benzoylperoxid, Fluka
BSS Balanced salt solution
Buthylmethacrylat, Merck
Cellulase Onozuka 3 S, Serva
cellulase ß-1,4-Glucan glucanohydrolase ; E. C. 3.2.1.4 Serva
Chitinase Poly-(1,4-ß-(2-acetamido-2-desoxy)-D-Glucose) -Glucanohydrolase ; E. C. 3.2.1.14. Sigma
Chitobiase Acetamidodeoxyglucohydrolase ; E. C. 3.2.1.3o Serva
Chromsäure, Fluka
DDSA 2-Dodecen-1-ylbernsteinsäureanhydrid, EGA
DEO 1,2:7,8-Diepoxyoctan, Merck
DER 736 Diglycidäther des Polypropylenglycols, Fluka
o-Dianisidin 4,4'-Diamino-3,3'-dimethoxydiphenyl, Fluka

Diäthylenoxid	(Dioxan), Fluka
Divinylbenzol, Merck	
DMAB	p-Dimethylaminobenzaldehyd, Sigma
DMAE (S - 1)	Dimethylaminoäthanol, Serva
DMP	2,2-Dimethoxypropan, Merck
GA	Glutardialdehyd, Fluka
Gentamicin, Schering	
GMA	Methacrylsäure-hydroxyäthylester, Serva
GOD	Glucose-Oxidase, Oxygen-1-oxido-reductase; E.C. 1.1.3.4. Sigma
Kaliumtetraborat, Fluka	
K_2EDTA	Aethylendiamin-tetraessigsäure-di-Kaliumsalz Dihydrat, Fluka
KSW	Künstliches Seewasser
Macerozym R-1o, Serva	
MES	Morpholinäthansulfonsäure, Serva
Methylmethacrylat, Merck	
MNA	Methyl-norbonen-2,3-dicarbonsäure-anhydrid, Fluka
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfon - säure, Fluka
Mycostatin, Serva	
NAG	2-Acetamido-2-deoxy-D-Glucose (TLC), Serva
NAGase	Chitinase
NDC	N,N-Diacetyl chitobiose, Sigma
NSA	Nonenylbernsteinsäureanhydrid, Serva
Osmiumtetraoxid, Fluka	
PEG	Polyethylenglycol 6ooo, EGA
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-aethan-sulfonsäure, Fluka
POD	Peroxidase; E.C. 1.11.1.7. Boehringer

Polyäthylenglycol 2oo, Merck
1,2-Propandiol, Merck
1,2-Proyplenoxid, Merck
PTFE — Polytetrafluorethylen, Fluka
PWS — Phosphorwolframsäure, Merck
Rinder - Serum - Albumin, Merck
TCH — Thiocarbohydrazid, Merck
Tetrachlorogold(III)-säure, Merck
TRIS — 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, Fluka
Triton N 1o1 — Alkylphenylpolyethylenglycol, Fluka
Trypsin — E. C. 3.4.21.4. Sigma
4-tert-Butylbrenzcatechin, Merck
UA — Uranylacetat, Merck
VCD (ERL-24o6) — Vinylcyclohexendioxid, Serva
WGA — Lectin aus *Triticum vulgare* (Wheat Germ Agglutinin),Fluka

2.3. Kulturbedingungen für die *Prasiola*-Klone und *Phycomyceten*-Kulturen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die vier untersuchten *Prasiola*-Stämme, die in KSW kloniert wurden (unterstrichen : Klone, die durch Frischmaterial erweitert wurden.)

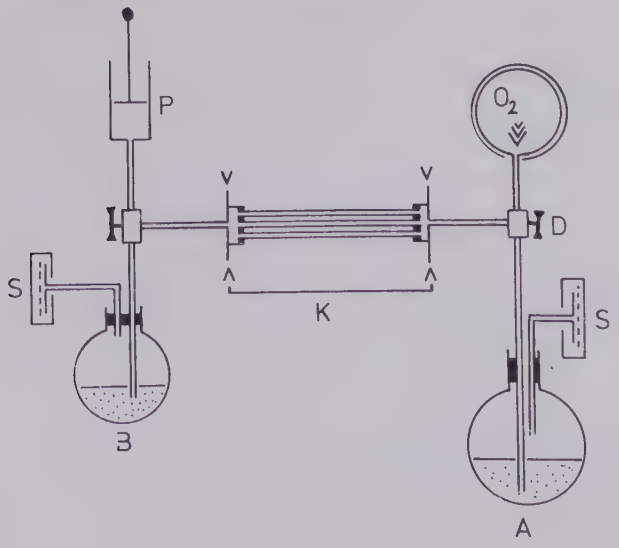
Kultur-Abk.	Herkunft	in Kultur seit
PSHe 68	Helgoland (Nordmole)	1968
PSHe 75	Helgoland (Südhafen)	1975
PSCd 72	Kanada (Halifax)	1972
PSIr 74	Irland (Galway)	1974

Die Kulturen PSHe 75 verdanken wir Herrn Dr. Dr. P. Kornmann / Helgoland, PSDd 72 Herrn Prof. Dr. K. v. Maltzahn / Halifax (Canada) und PSIr 74 Frau Prof. Dr. M. de Valéra / Galway (Irland).

Die Algen wurden bis zum Versuchsbeginn in nichtaxenischer Kultur bei 14 ± 1°C, ca. 2800 Lux Beleuchtungsstärke und einem Licht - Dunkel - Wechsel (LD) von 12 / 12 Stunden in KSW submers gehalten.
(KSW nach RAYMOND et al (1963))
Die durch marginale Sporulation der adulten Thalli freigesetzten Aplanosporen wurden ebenfalls bei 12 h LD (2800 Lux) und 14 ± 1°C angezogen. Nach jeweils 60 Tagen (einsetzende Sporulation) konnten neue Sporen in frische Nährmedien transferiert und Subkulturen angelegt werden. Die Klonierung der Kulturen erfolgte nach jeder Passage durch Aufnahme in siliconisierte Kapillarröhrchen (50 µm ϕ) und Ausblasen mit medizinischem Sauerstoff in KSW. Die Klonierausbeute lag in der Regel bei 85 %, wobei eine zusätzliche Chloroformierung der Kapillarröhrchen eine weitere Senkung auf 80 % erbrachte. (Ausgangskonzentration 320 Aplanosp./ml)=K_A.
Axenische Linien wurden weiterhin mit Streptomycin (50 µg/ml Endkonzentration) und Mycostatin (20 µg/ml Endkonzentration) belegt. Mycostatin ist relativ instabil und zersetzt sich bei 15°C in 4 - 5 Tagen, sodaß eine Kontamination wirksam unterbunden und die Beeinflussung durch das Antibiotikum als relativ gering eingeschätzt werden durfte. Das folgende Schema verdeutlicht den apparativen Aufbau, wobei mit dem Kapillarhalter (K) mit einer Füllung unter mikroskopischer Beobachtung kloniert wurde und mit mehreren Kapillaren in einer Ebene im Fluß axenische Aplanosporensuspensionen hergestellt werden konnten.
Mit einer einzelnen siliconisierten Kapillarröhre können somit von frisch aus dem Biotop entnommenen Thalli unter

enzymatischem Aufschluß der primären Zellwand (s. Kap. 2.3.2.) mehrere axenische Klone angelegt werden.
Die aus dem Zellverband gelösten Thalluszellen werden durch die Pumpe (P) aus der Suspension in die Kapillaren gezogen, kurzzeitig im Wasserbad (1o sec/ 65 °C) erhitzt und unmittelbar in den gekühlten Auffangbehälter geblasen.
Dadurch ist eine etwa vorhandene enzymatische Aktivität aus Kap. 2.3.2. herausgenommen und eine Kontamination durch den *Phycomyceten* zusätzlich wirksam unterbunden.
Ein Einfluß auf die Vitalität der Thalluszellen konnte nicht festgestellt werden. Es sollten jedoch bei diesem Verfahren ältere Thalli des Prasiola - Stadiums aufbereitet werden, da mit zunehmender Dicke der Sekundärzellwand ein erhöhter mechanischer Schutz vorliegt.
Die natürliche Thermostabilität der Grünalge ist bei dieser Behandlung sicherlich noch nicht voll ausgeschöpft da *Prasiola* im Supralitoral bei direkter Sonneneinstrahlung und Prismeneffekten durch anhängende Wassertropfen noch weit höhere Temperaturen längerfristig bewältigen muß.

Aufbauschema der Apparatur



O_2 = Sauerstoff-druckbehälter
S = Sterilfilter als Ventil
D = Dreiwegeventil
A = Suspensions-behälter
K = Kapillaren-halter (herausnehmb
P = Vakuumpumpe
B = Auffangbehält mit KSW

Aplanosporen oder isolierte Thalluszellen (mazerierte Thalli) werden durch Vakuumpumpe (P) aus Suspensionsbehälter (A) in den Kapillarenhalter (K) aufgezogen und nach Präparation - über entspechende Umschaltung der Dreiwegeventile (D) - mit klinischem Sauerstoff in den Auffangbehälter (B) ausgeblasen.
Die Be- und Entlüftung des Systems erfolgt über hydrophobe PTFE - Filter mit PES - Stützgewebe (TE 3o o,o2 µm / Schleicher und Schüll).
Der herausnehmbare Kapillarenhalter (K) ermöglicht eine mikroskopische Kontrolle der präparierten Zellen auf Kontamination bei der Anreicherungsphase und Ausbau der Suspensionen. Hier können auch im Fluß geringe Dosen o,2 mM Diachrom (Oxaminblau 4 R s. 2.7.) durch die Kunststoffmanschetten injiziert werden.

Kulturbedingungen für die *Phycomyceten* - Kulturen

Die Isolierung des *Phycomyceten* war Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen. Versuche mit handelsüblichen Standardsubstraten blieben erfolglos, sodaß versucht wurde, mit *Prasiola* - Homogenat zu isolieren.

Tallus - Explantate von *Prasiola stipitata* mit anhaftenden *Phycomyceten*-Zellen (s. Abb. 2 a) wurden in PSHv - Nährböden eingesetzt und mit BSSm - Phase (s. S. 17) überschichtet. Bei 25°C unter Dauerdunkelbedingungen und einer Passagenlänge von 6 Tagen im Brutschrank inkubiert. Danach konnten mehrere mit *Phycomyceten* - Zellen besetzte PSHv - Exzidate entnommen und Subkulturen angelegt werden.
Die Subkulturen erhielten nunmehr gleiche Umweltbedingungen wie die *Prasiola* - Kulturen (15°C / 12 h L/D), wobei die applizierten Antibiotika Streptomycin und Mycostatin durch 5o mcg/ml Gentamicinlösung ersetzt wurden. Somit konnte die stets hohe Kontamination der Zelloberflächen durch Caulobacter eingedämmt werden.

Abb. 2 a (+) Tordierter *Prasiola*-Thallus mit anhaftenden *Phycomyceten*-Zellen im Stadium vor Entnahme der Exzidate. Raster 1 mm.

Abb. 2 b (−) Axenische *Prasiola* - Thalli nach Klonierung (s. 2.4. u. 2.3.) im entsprechenden Stadium. Raster 1 mm.

Die Stabilität von Gentamicin ist bei pH 2 - 1o und 37°C laut Hersteller Schering ca. 15 Tage.
Im Tropf isolierte Zoosporen wurden mit BSS direkt auf PSHv - Nährböden transferiert und in 12 L/D (15°C) verbracht.
Diese Parallelkulturen enthalten keine Antibiotika, da im Tropf nur sterilfiltrierte Nährlösungen (Sartorius Membranfilter o,22 µm ϕ) angeboten wurden und die Zoosporen in der Perfusionskammer mit Gentamicin - haltigem Citrat - Puffer klargespült waren (in Reflux durch o,o2 µm ϕ Membranfilter).

2.4. Methoden zur Bestimmung der Wachstumsraten

1. Zur Bestimmung der Zellzahlen und Wachstumsrate von *Prasiola stipitata* - Thalli im Hormidium - und Schizogonium - Stadium mußten die Zellverbände aufgelöst werden. Die in 5% igem Alkohol mehrfach gespülten Thalli wurden in o,5 n NaOH von den anhaftenden Schleimen gereinigt und nach 12-stündiger Inkubation mit Cellulase[1]/ Macerozym[2] in o,25% Trypsin - Lösung verbracht (37°C / 1o min).

1 g *Prasiola* - Thalli (Frischgewicht) in 5o ml Enzymlösung aus 1,5% Cellulase Onozuka 3 S und o,5% Macerzym R - 1o (w / v) werden bei 6o Upm im Rotationsinkubator 12 h eingestellt (45°C / pH 4,5).

Die Enzymlösungen enthielten zur osmotischen Stabilisierung o,15 M Mannit und o,3 M Sorbit (reale Osmolalität o,5 x $1o^3$ mOsmol / kg H_2O , Bestimmung über Gefrierpunktserniedrigung mit Osmometer Typ M; Knauer, Mischungsverhältnis 1 : 1).
Die Zellsuspensionen in o,o2 M EDTA wurden in einem Neubauer - Hämocytometer direkt bestimmt (o,o625 mm^2 x o,1 mm).

2. Die Zellzahlbestimmung der *Phycomyceten* - Kulturen erfolgte durch Vitalfärbung mit Oxaminblau 4 R und Auflage eines Millimeter - Rasters.

[1] Cellulase, Onozuka 3 S aus *Trichoderma viride* (1,5 U /mg) enthält zusätzlich Hemicellulasen und baut Mannane, Pectine und andere polymere Kohlenhydrate ab (pH 4,o - 5,o).

[2] Macerozym R - 1o aus *Rhizopus sp.* enthält Pectinase, Hemicellulase und andere Faktoren die pflanzliche Gewebe abbauen (pH 3,5 - 7,o).

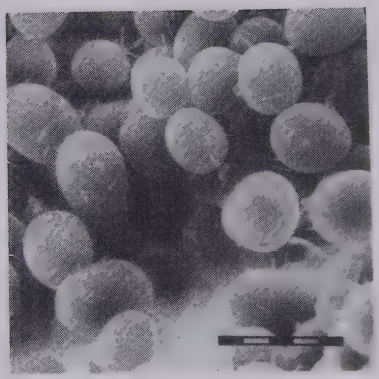


Abb. 3 *Prasiola* - Zellsuspension nach Thallus - auflösung durch Cellulase / Macerozym. Raster 3o µm.

Die vielfach angezeigte Fluoreszenzfärbung mit Calcofluor White zum Nachweis von Zellulose- oder Chitinfibrillen (HERTH 198o bzw. SCHNEPF 198o) konnte in dieser Arbeit keine Verwendung finden, da eine Spezifität nach o. g. Autoren nicht festgestellt werden konnte. In Kontroll- Experimenten mit anderen Strukturpolysacchariden (Dextrane und Hyaluronsäuren) und sogar mit Agar agar in Konzentrationen > 5% , wies die Unterlage chromatische Adsorptionen auf. Die eingesetzten PSHv - Nährböden waren ebenfalls vom Fluorochrom durchzeichnet. Aufgrund der fehlenden Selektivität des Farbstoffes wurde auch im folgenden Chitinnachweis auf Calcofluor White verzichtet.

Bestimmung des Trockengewichtes der *Prasiola* - Kulturen

Grundlage für alle biochemischen und elektronenmikroskopischen Serienuntersuchungen in dieser Arbeit war die Anreicherung und der Ausbau von Zellmaterial. Die Effektivität der Nährlösungen und die optimale Konditionierung der Organismen ist am Zellzuwachs meßbar. Als Maß für den Zellzuwachs wird hier die Trockengewichtsbestimmung eingeführt, wobei in der Vorbereitung des Materials und Messung langer Kulturreihen Substanz für Prasiola - Homogenat (kryostabilisiert) anfiel, die jedoch ausschließlich aus axenisch geführten *Prasiola* - Kulturen gewonnen wurde. Axenische Kulturen wurden in 5 d - Abständen (Hormidium - Prasiola - Stadium) den Kulturschalen entnommen und gefriergetrocknet, wobei - 6o°C (>1o^{-4} Torr) nicht überschritten werden sollen, da sonst Abplatzungen auftreten. Die Trockenzeit beträgt ca. 6 Tage ; tordierte 4o - 6o d - Stadien sollten 1 - 2 Tage länger kryostabilisiert werden. Nach HEINE (1974) muß ohne Peltierelemente in linearer Phase getrocknet werden, da bei größeren Proben die erforderlichen Temperaturen nicht erreicht werden können.
Die beiden Graphen in Abb. 4 veranschaulichen einerseits die erhöhte Ausbeute an Trockenmaterial, verbunden mit einer Verkürzung der vegetativen Phase, und andererseits die relativ linearen Zellzuwachsraten bei optimierter Nährstofflage im Gegensatz zur kurzen exponentiellen Phase des relativ mageren KSW - Mediums. Es scheint ein Zusammenhang zwischen minimal erreichbarer Zellmasse und dem Sporulationsverhalten der Thalli zu bestehen. Im Vergleich zur Zellzahl in BSS

(s. Abb. 4) kann mit Sicherheit von nahezu linearem Wachstum bei optimalen Bedingungen gesprochen werden.

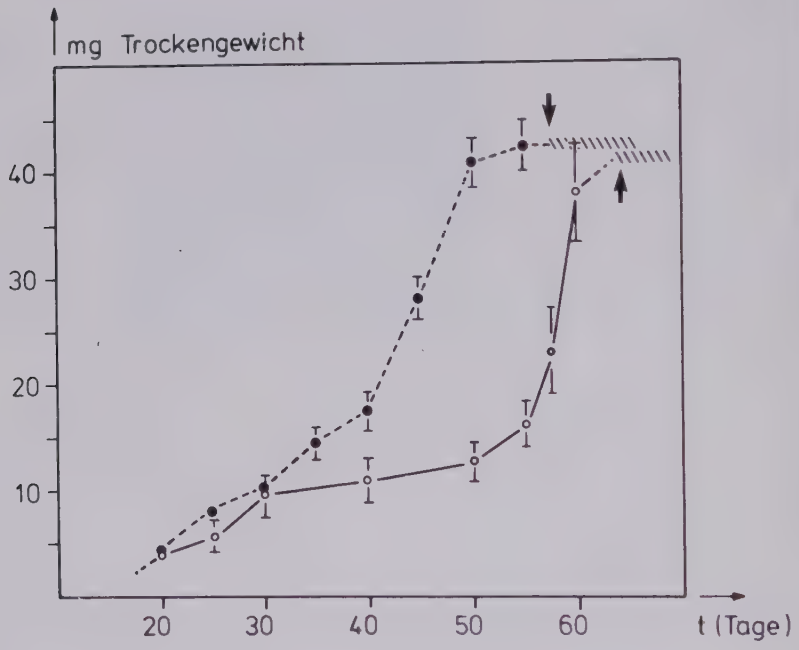


Abb. 4 Trockengewicht der *Prasiola* - Stamm-Kulturen in KSW o-o-o und BSSv •-•-•- bei 25 x 10^2 Aplanosporen im Ansatz. ➔ Sporulation

2.5. *Prasiola* - S - Homogenat (sterile Thalli)

1. *Prasiola*-Thalli wurden im 6o d - Stadium vor dem Einsetzen der marginalen Sporulation aus den Kulturschalen geerntet, mehrfach in Aqua bidest. gewaschen und sedimentiert.
2. Aufschluß der Thalli (2 g Frischgewicht in 1o ml o,o5 M Phosphat - Puffer pH 7,2 (4°C)) mit fein pulverisiertem Aluminium im Broeck - Homogenisator.

Anschließende Zentrifugation und Trennung vom Al - Präzipitat.

3. Zugabe von 5o mcg Gentamicinlösung pro ml Homogenat. Durch Dialyse - Dialyseschlauch mit o,5 M EDTA - Lösung vorbehandelt - gegen kaltes, pulverisiertes Polyethylenglycol 6ooo wird das Homogenat auf ca. 3o% des Ausgangsvolumens konzentriert (Haltbarkeit des Präparats unter N_2- Atmosphäre mindestens 14 Tage).
4. Ausbau zum eigentlichen PSHv bei 1oo ml Phosphat - gepuffertem mono - layer Medium :

PSH	5 g
Na-Alginat	o,5 g
Agarose	3,5 g
Mannit	1,5 g
Sorbit	1,5 g
D-Cellobiose	o,5 g

5. Tyndalisation, d. h. 2 - fache fraktionierte Sterilisation bei 1oo°C mit zwischenzeitlicher Bebrütung im Kulturschrank.

2.6. Zusammensetzung der Kulturmedien in mg/l

	KSW	BSS
NaCl	27 ooo	38 ooo
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	6 6oo	7 2oo
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	5 6oo	6 5oo
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	1 5oo	15o
KNO_3	1 ooo	1 2oo
KH_2PO_4	7o	43o
$NaHCO_3$	4o	-
$ZnCl_2$	o,o4	o,6
H_3BO_3	o,6	2,o

$CoCl_2 x\ 6\ H_2O$	o,o15	o,o4
$CuCl_2 x\ 2\ H_2O$	o,o4	-
$MnCl_3 x\ 4\ H_2O$	o,4	o,8
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	o,37	o,9
NaFeEDTA	o,oo2	o,6
$FeCl_3 x\ 6\ H_2O$		1,9
$CaCO_3$		2o,o
$ZnSO_4 x\ 7\ H_2O$		o,o2
SeO_2		o,oo1
$Cu(NO_3)_2 x\ 3\ H_2O$		o,o2
Selenharnstoff		o,oo4
Cyanocobalamin		o,oo1

Vitamin mix (Thiamin-hydrochlorid 2oo µg,
Biotin o,5 µg,
Cyanocobalamin o,o5 µg,
Nicotinsäure 1oo µg,
D - Pantothensäure 1oo µg,
Riboflavin 5 µg,
Pyridoxin-hydrochlorid 4o µg,
Pyridoxamin-dihydrochlorid 4o µg,
Cholinchlorid 5oo µg,
meso-Inosit 2oo µg,
Thymin o,8 mg,
Urazil-4-Karbonsäure 26o µg,
Folinsäure o,2 µg,
Folsäure 2,5 µg.)

BSSv = BSS + 1 ml Vitamin mix /l
BSSm = BSS ohne B_{12}
PSHv = *Prasiola stipitata* - Homogenat + 1 ml Vitamin-mix /l

Sterilisation der Kulturmedien und Enzymlösungen

Die mit o,1% Chloroform (w/v) konservierten KSW und BSS - Stammlösungen wurden bei 12o °C und 1,4 atü autoklaviert, wobei die Chloroformreste entwichen. Durch den Sterilisationsvorgang sank der pH - Wert von 6,8 auf 6,4 (KSW) bzw. 6,7 auf 6,5 (BSS). Vitamin mix, Enzymlösungen und Transportmedium konnten nur kalt sterilisiret werden. Die Lösungen wurden im Vakuum-Filtrationssystem Filtrodyn (nach RAWE) durch PTFE mit Polyesterstütze (o,o2 µm ϕ) sterilfiltriert.

2.7. Vitalitätstest mit Oxaminblau 4 R

Oxaminblau 4 R (Di-Natriumsalz von p,p'-Diamino-m,m'-dimethoxydiphenyl-disazo-bi-(1-naphthol-4-sulfonsäure)) ist ein diachromer Farbstoff, dessen chromatophore Gruppe die Azo-Gruppe - N = N - darstellt (s. Abb. 5).

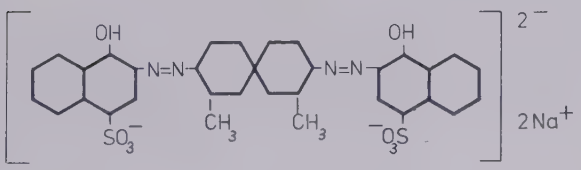


Abb. 5 Di-Natriumsalz von Oxaminblau 4R
(Chroma-Gesellschaft Stuttgart)

Auxochrome sind die 2 SO_3^- - Gruppen. Die Eigenfarbe der molekular gelösten Modifikation des Di-Natriumsalzes ist blau und schlägt in alkalischer Richtung bei pH 8,5 nach rubinrot um. Weder eine Substantivierung

des "Substrats" *Prasiola*, noch eine intrazelluläre Einfärbung konnte nachgewiesen werden, d. h. die in das Färbebad eingebrachten *Prasiola*-Thalli konnten vital nicht durchgefärbt werden. Erst in Verbindung mit Kupplungskomponenten (2-Naphthol) oder Beizmittel (Tannin) wird das Sorptiv an die Zellulose-Zellwand von *Prasiola* angebunden, während im gleichen Verfahren die Anbindung an Zellwandfragmente des *Phycomyceten* erfolglos bleibt. Die Färbungen des *Phycomyceten* bleiben für ca. 2 h konstant und werden von vitalen Zell - Linien nach ca. 3 h abgebaut. Eine höhere Infiltrationsrate bei erniedrigten Osmolaritäten führt zu entsprechend intensiveren Einfärbungen. Toxiditätsschwellenwert des di-Natriumsalzes liegt bei o,25 mM und 22o mOsmol.
Die Anwesenheit von Farbstoffresten führte bei den anschließenden REM und TEM - Präparationen zu keinen nachweisbaren Artefakten, umsomehr war das Maß der damit untersuchten Vitalität des *Phycomyceten* Grundlage für eine erfolgreiche Infiltration der Medien.

2.8. REM - Präparation

2.8.1. Fixierung (Perfusionfixation, Kammervolumen 1,25 cm^3 / Austauschgeschwindigkeit o,25 ml / min / Rotation 5 Upm)

1. Reinigung der Zelloberflächen in Perfusion mit o,1 M TRIS - Maleat - Puffer (25°C / pH 6,3 / 1o min) Puffer - Saccharose auf 35o mOsmol hypoton einge - stellt.
2. 1,2% GA - Lösung in o,o75 M Phosphat - Puffer. Zugabe von o,1% Dikaliumäthylendiamin - tetraacetat (w/v) und 3,2% Saccharose (w/v)

(K_2EDTA - Antikoagulantium / 4°C / pH 6,5 / 3 h / 33o mOsmol)

3. Spülen mit Phosphat - Puffer - Saccharose - Lösung (25°C / pH 6,5 / 3o min / 35o mOsmol)

2.8.2. Stabilisierung der Exzidate

Infiltration des in seiner monomeren Form absolut wasserlöslichen Monomers GMA zur Stabilisierung des *Phycomyceten* - Sediments bzw. Exzidates. Das mit o,o25% 4 - Methoxyphenol inhibierte GMA wird über Amberlyst A 26 - Ionenaustauscher isoliert (Vorpolymerisation von LEDUC et BERNHARD (1967) für Methacrylsäureester ist nicht angezeigt).

1. 15% GMA + 1% Ammoniumpersulfat (v/w) als sekundärer Wärmekatalysator in der Sputteranlage, wo kurzfristig 7o°- 85°C (kalorimetrisch bestimmt) durch die Strahlungswärme aus Gasplasma, der Kathode und Elektronenbombardement der Anode anfallen. Die quasi - unterstützende Nachhärtung des primär UV - gehärteten Polymerisats unterstützt die durch Waschvorgänge ausgedünnte Monomerlage. Eine Kondensation der Monomere ist somit unter Konzentrationen von 5% des Monomers noch möglich.
2. 5o%, 8o% und 95% Infiltrationsstufen in aqua bidest. (25°C / 2o min)
3. 95% GMA unter Zusatz von 1% Benzoylperoxid (v/w) als Initiator (25°C / 2 h)
4. Auswaschen der GMA - Reste und Reinfiltration des GMA / Benzoylperoxid - Gemisches auf ca. 1o% Endkonzentration (25°C / je 1o min / 95%, 8o%, 5o%, 3o%, 1o%)
5. Spülen mit Eiswasser (< 4°C / 2 min)
6. Postfixation mit 1% OsO_4- Phosphatpuffer - Lösung (4°C / 1 h / pH 6,8)
7. Auswaschen der Fixantien mit Eiswasser (5 min)

8. UV - Polymerisation mit UV > 2oo nm (4°C / 48 h)
9. Dehydratisierung mit Äthanol (aufsteigend 1o% / 2o min / 1oo% 3 h)
1o. CPD[1] über CO_2 (P_k = 74 bar, T_k = 31°C)
11. Sputtern im Argon - Inertgasfeinvakuum (< o,1 Torr / 1,2 kV / 2o mA)
    Der nach STEIER (1976) umgebaute Rezipient (Polaron - Sputter E 5ooo) ist mit einem Gold - Palladium - Target belegt (ECHLIN (1978)). Bei rotierender Probenhalterung (165 Upm) und Kippwinkel von 4o° entspricht die Sputterzeit T_s = 1o min einer relativen, spektroskopisch bestimmten Schichtdicke von 32o ± 2o Å Au / Pd. Schwankungen in der Au / Pd - Auflage um 2o Å sind durch die Geometrie des besputterten Körpers bedingt.

2.9. TEM - Präparation

2.9.1. Fixierung (Perfusionsfixation, Kammervolumen 1,25 cm³ / Austauschgeschwindigkeit o,5 ml /min / Rotation 1o Upm)

1. 3,5% Glutardialdehyd - Lösung in o,3 M PIPES/NaOH - Puffer (pH 6,8 / 25°C / 2 h)
   Die kryoskopisch bestimmte reale Osmolalität ist 96o mOsmol = SW - Konzentration.
   Die Tonizität ist einschließlich der Postfixation stets SW - isoton.
   Piperazin-N-N'-bis (äthansulfonsäure) wurde als Zwitterionenpuffer mit NaOH den üblichen s-Collidin - und Cacodylat - Puffern vorgezogen, da keine Extraktionen am EM - Bild auftraten und das Cytoplasma des *Phycomyceten* insgesamt elektronenstreuender, damit vollständiger erschien.
2. 1o x - Waschen mit o,3 M PIPES - Saccharose - Lsg.

CPD[1] Critical Point Drying

(v/4,5%)(pH 6,8 / 25°C / 1o min)
Saccharose ist ein nicht reduzierendes Disaccharid vom Trehalosetyp. Dadurch fehlen die typischen Zuckerreaktionen, wie Osazon - und Oximbildung sowie Mutarotation. Als schwache Säure ($K \sim 1o^{-13}$) wird der pH der Waschlösung auch bei höheren Konzentrationen (> 5%) nur geringfügig verändert. Gegenüber NAG - Nachweisreaktionen ist Saccharose inert.

3. 1,5% OsO_4- Lösung in o,o5 M PIPES/NaOH - Puffer (pH 7,1 / 4°C / 3 h)
   Die angegebene Osmiumtetraoxid - Konzentration erniedrigt während der Fixation den pH auf 6,9.
4. 1o x - Waschen mit o,3 M PIPES - Saccharose - Lsg. (v/4,5%) (pH 6,8 / 25°C / 1o min)
5. 1,2% Thiocarbohydrazid - Lösung in o,5 M MES - Puffer (pK_s = 6,15 / 2o°C // pH 6,2 / 5o°C / 2o min)
   SELIGMAN (1966) / KELLEY (1973) impliziert eine OTO - Reaktion von TCH mit reduziertem OsO_4, d. h. TCH ersetzt in zwei Reaktionsschritten die beiden freien Sauerstoffatome in wässriger Lösung. TCH kann nun seinerseits neues OsO_4 ankoppeln. Das acide Medium, die verkürzte Verweildauer im Intermedium und die schwächere TCH - Konzentration unterbrechen die indifferenten Reaktionen nach der ersten OTO - Reaktion (s. Abb. 6).

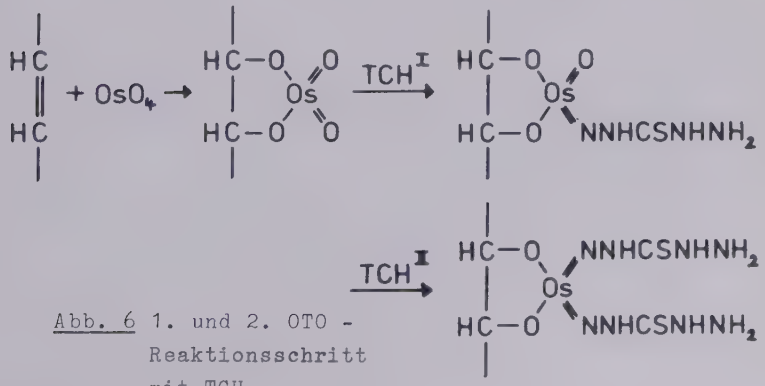


Abb. 6 1. und 2. OTO - Reaktionsschritt mit TCH

Die lipoidhaltigen Kompartimente werden durch TCH stärker kontrastiert, wobei die eingetretenen Osmatbildungen mit Lipoiden und die Polykondensationen von Lipoiden über Osmatbrücken nachgezeichnet werden. RIEMERSMA (1968) wies nach, daß pro Doppelbindung in Lipoiden ein Atom Os eingebaut wird. PETERS et ASHLEY (1967) konnten mittels autoradiographischer Methoden die schwache Bindung von Os an freie Aminosäuren verifizieren. Demnach führt ein TCH - Transfer auch in diesem Falle zu EM - Auflösungsverbesserungen.

6. Postfixation mit o,5% OsO_4 - Lösung in o,o5 M MES - Puffer (pH 6,5 / 4°C / 1o min).
   Waschen in o,o5 M MES - Puffer.

2.9.2. Dehydratisierung und Kontrastierung

1. 1,5% Uranylacetat - Lösung in aqua bidest. (25°C / 3o min)
2. Äthanolreihe 2o%, 3o%, 4o%, 5o%, 8o%, 95%, 1oo% (4°C / je 3o min)
3. Äthanol / Propylenoxid 1 : 1 Intermedium (25°C / 2 h)
4. Propylenoxid / Polymerisat 1 : 3 (25°C / 12 h)

1,2 - Propylenoxid ist Vehikel für das Einbettungsmedium und als Infiltrationsstufe für DEO / VCD - Polyaddition eingeführt, da Äthanol die Polymerisation bis 8o ppm inhibiert.
DMP (2,2-Dimethoxypropan) - Kontrollen zeigten die Äthanolsensibilität des Epoxid - Gemisches auf, da die Dehydratation über chemische Hydrolyse erfolgt

und nicht durch physikalischen H_2O - Austausch. D. h. Äthanol - Inseln sind ausgeschlossen. Für Hochauflösungsfragen war die DMP - Präparation jedoch ungeeignet.

2.9.3. DEO - VCD - Polyaddukt - Einbettung

Die Polykondensatbildung der Methacrylate, wobei Makromoleküle unter Abspaltung von Co - Produkten (H_2O und Alkohol) gebildet werden, führte bei den vorliegenden Untersuchungen zu sphärischen Polymerisationen, d. h. Vakuolisierungen und Membranfrakturen. Ebenso sublimieren die linear kondensierenden Methacrylate, auch unter Zugabe von Divinylbenzol (stabilisiert mit o,2% 4-tert-Butylbrenzcatechin) auf Butyl- bzw. Methylmethacrylat zur 3 D - Vernetzung, im Elektronenstrahl bei Schnitten unter 8oo Å und Beschleunigungspannungen > 4o kV.
Eine Polyesterharzeinbettung (Mischpolykondensation von Dicarbonsäureanhydride mit 2-wertigen Alkoholen wie Propandiol und Glycol) war aufgrund der Alkoholunlöslichkeit der Polyester auszuschließen, da eine Dehydratisierung mit Aceton im Sediment zu starken Extraktionen führte, und offensichtlich Elemente mit hohen Lipid - und Proteinanteilen - korreliert mit erniedrigten OsO_4 - Konzentrationen - nicht mehr darstellbar waren.
Die Epoxidharze bilden im Gegensatz zu den Methacrylaten und Polyestern hochmolekulare Polyaddukte. Für diesen Reaktionstyp ist charakteristisch, daß Wasserstoffatome funktioneller Gruppen von Monomer zu Monomer wandern. Ursache ist die Polarisierung der funktionellen Gruppe mit einer Positivierung des Kohlenstoffatoms.

KUSHIDA (1962 / 67) untersucht erstmalig ein Gemisch aus einem weicheren Polyglycolepoxid D.E.R. 736 und einem härtere Polymerisate liefernden Epon 812.
In den Rezepturen von SPURR (1969) wird das Dicarbonsäureanhydrid NSA zur Bestimmung des Härtegrades des Polymerisates angeführt.
Diese aktuelle Standard - Einbettung wird auch von GANTT (1980) für schwer konditionierbare marine Organismen, insbesondere *Chlorophyceae* und *Phaeophyceae*, empfohlen.
Eine gleichförmige Penetration des Einbettungsmediums konnte jedoch bei *Prasiola stipitata* und dem *Phycomyceten* nicht bestätigt werden.
Die Osmostabilität des *Phycomyceten* erforderte eine extrem niedere Viskosität des Polymerisats incl. Flexibilisator und Accelerator.
Die Viskosität von ca. 60 cps (centipoises) eines komplementären Epoxidgemisches nach SPURR (1969) mußte für eine *Phycomyceten* - Präparation gesenkt werden, wodurch unter Reduktion des Flexibilisators DER und des Härters NSA die Stabilität des Polymerisats im Elektronenstrahl ungenügend war. Die mangelhafte 3 D - Polyaddition im Cytoplasma des *Phycomyceten* führte zu enormen Schrumpfungen (25%) und den damit definierten Artefakten. Eine Senkung der Viskosität auf ca. 40 cps, verbunden mit einer gleichzeitigen Steigerung der Polyadduktbildung, konnte durch Zugabe eines weiteren Partnerepoxids (DEO) erreicht werden. Ein Austausch der Anhydride brachte eine weitere Senkung der Viskosität auf 32 cps und eine Verminderung der Disproportionierung auf unter 5% (Messung nach REIMER (1959)).

2.9.4. Einbettungsmedien

I. 1,2 : 7,8 - Diepoxyoctan (DEO) / VCD 1 : o,6 14 g
DER 736 (Diglycidäther des Polypropylenglycols) 5 g
DDSA / MNA - Anhydridgemisch 1 : 1 26 g
DMAE - Katalysator o,5g

Einbettungsmedium (25°C / 32 cps / O_2- frei)
Polymerisationstemperatur (6o°C / 6o h)
Im Hochvakuum P_T = 1o^{-5} Torr evakuiert und
mit trockenem Stickstoff belüftet. 45,5 g

II. DEO / VCD o,8 : 1 14 g
DER 736 2 g
DDSA / MNA - Anhydridgemisch o,5 : 1 2o g
DMAE - Katalysator 1 g

Schnellpolymerisat (25°C / 28 cps / O_2- frei)
Polymerisationstemperatur (6o°C / 36 h)
Im Hochvakuum P_T = 1o^{-5} Torr evakuiert und mit
trockenem Stickstoff belüftet. 37 g

2.9.5. Schnittkontrastierung mit Chromylchlorid

Die belegten Cu - Netze werden auf hydrophobe PTFE - Filter (TE - Stützgewebe / 35 µm ϕ) in den Filterhalter einer Antlia - Druckfiltrationspumpe eingebracht. Der Rezipient wurde mit einer Lösung aus :

1o ml 1 M $K_2Cr_2O_7$
1o ml 4 M KCl
1o ml 3 M H_2SO_4 aufgefüllt.

Die Gasphase sollte mindestens 3o% des Reaktionsraumes bemessen und bei 4°C entspannt werden. Die entstandenen Chromylchloriddämpfe werden mit 1,5 atü durch die hydrophoben Filter gepresst.
Die Kontrastierungszeit (5o - 8o sec) wird über ein Dreiwegeventil durch Überblasen mit klinischem Sauerstoff beendet.
Die erstmals von BULLIVANT et HOTCHIN (196o) eingesetzte Kontrastierung mit Chromylchlorid an Pankreas - Schnitten zeichnet sich durch gleichmäßige Hervorhebung aller Zellkomponenten aus und ist im vorliegenden Falle einer Bleicitrat bzw. PWS - Behandlung überlegen, da Plasmalemma und Vakuolenmembran ebenfalls deutlich nachgezeichnet sind und keine anschließende 2-phasische Bearbeitung notwendig ist.
Gegenüber der Methode von BULLIVANT et al (196o) ist eine Präzipitation ausgeschlossen und die durch Abschwemmen anfallenden Artefakte können vermieden werden.

2.1o. Freeze - etching und Replica

1. a. 1,5% -GA / BSSm - Lösung (25°C / 1o min)
   b. Nach der GA - Fixierung in BSS wird die H_2O-Phase gegen Dioxan ausgetauscht, dadurch brechen die Membranen nicht mehr entlang ihrer hydrophilen Zonen, sondern je nach ihrer chemischen Konstitution und Affinität mehr oder weniger zufällig durch inter - und intrazellulären Strukturen (BUCHHEIM (1976)). Aus Gründen der Oberflächenkontamination sollte die Ätztemperatur jedoch auf - 12o°C erniedrigt werden.
2. 25% Glycerin / BSS - Lösung (25°C / 1 h)
   Glycerin als Kryoprotectans ermöglicht eine Vitrifikation der mitgeführten *Prasiola*-Thalli

bis o,2 mm bei v_k = 1oo°C /sec. Höhere Werte konnten auch über Äthanol-phasen nach SCHILLER etTAUGNER (198o) nicht bestätigt werden.
Bei Zellsystemen, die submers angezogen wurden und mehr als 9o% H_2O bezogen auf das Gefriertrockengewicht haben, reduziert sich dieser Wert auf 8o°C / sec bei o,o5 mm ϕ. Darüberhinaus lagen bei einer kombinierten Präparation von *Prasiola* und *Phycomycet* eutektische Mischungen im Cytoplasma vor.

3. Transferieren in flüssigen Stickstoff - 196°C über Freon 22 - 16o°C (Aufhebung des Leidenfrostschen Phaenomens).
4. Gefrierbruch bei - 1oo°C / - 12o°C.
5. Ätzung nach MOOR (1969/73) und KÖHLER (1972), d. h. oberflächliche Gefriertrocknung durch Vakuumsublimation bei definierten Temperaturen P_T = 1o^{-7} Torr.
   ΔT entsprachen 45o Å Ätztiefe (± o,5°C ≃ ± 1o% Ätztiefe).
6. Elektronenstrahlverdampfung von Pt (< 45°) ca. 2o Å in EMV o52 Balzers C (< 9o°) ca.2oo Å
7. Reinigung der Replicaoberflächen mit 4o% Chromsäure (CrO_3) und Nachbehandlung mit Javelle Javellewasser (NaOCl in NaOH / 25°C / 2 h).

Nomenklatur der Replicaoberflächen

Die Nomenklatur der Membranoberflächen ist identisch mit dem Vorschlag von BRANTON et al (1975), der protoplasmic half (P) von endoplasmatic half (E) abgrenzt, wonach zwei natürliche, hydrophile Surfaces (ES und PS) und zwei künstliche, hydrophobe Fractures (EF und PF) als Ansichten zu benennen sind.

p = dem Zytoplasma, Nucleoplasma oder der mitochondrialen Matrix benachbarte Membranhälfte.

E = dem extrazellulären, exoplasmatischen oder endoplasmatischen Raum zugewandte Membranhälfte. Per Definition ist demnach das Innere der Vakuolen, Phagosomen und Lysosomen exoplasmatisch ; die Zisternen zwischen innerer und äußerer Kernmembran endoplasmatisch.

2.11. Reinigung der Chitinase

Chitinase ist spezifisch für lineare Polymere aus AG. Spaltet jedoch nicht Chitobiose. Es hydrolysiert natives Chitin zu Chitobiose. COHEN (1974) und HERTH et al (1977) bestätigen die Freisetzung von NAG - Monomeren nur bei Verwendung von kolloidalem Chitin als Substrat.
Das Chitinase - Präparat enthielt bei Lieferung Amyloglucosidase (o,o5 U / mg Trockensubstanz, Aktivitätsbestimmung über Glycogen, 34o nm).

1. 25 mg Chitinase in o,o5 M Phosphat - Puffer pH 6,3 (1o ml) und 2,5 ml kolloidales Chitin 11,1 mg /ml (kolloidales Chitin nach LUNDBLAD et al (1974))
   Inkubation 1o min / 25°C .
2. Nach Zentrifugation (2o x $1o^3$ x g / 5 min) wird das Pellet in 5 ml Puffer und 2 mg Rinder - Serum - Albumin resuspendiert.
3. Inkubation der Suspension bei 3o°C / 2 h .
4. Dialyse gegen o,o5 M Phosphat - Puffer pH 6,3 und Sedimentation bei 12 x $1o^3$ x g .
   Aktivität 5o% d. h. 1,5 U / mg Trockensubstanz nach Beendigung des Präparationsganges.

2.12. ABTS -ß -D -Glucose - Nachweis

Die heterozyklischen 2,2' - Azino-di-(3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)) bildet mit zwei höheren Oxydationsstufen bis zur Azodikation ein durch zwei Elektronenübergänge verbundenes reversibles Redoxsystem (HÜNIG (1964)). Das Ammoniumsalz der reduzierten Stufe von ABTS ist farblos und gut wasserlöslich und nicht autooxydabel. Die Absorptionsspektren der reduzierten Stufe (a) und des Radikalkations (b) von ABTS weisen ein stetes Maximum bei 343 nm (a) und 42o nm (b) auf (s. Abb.7).

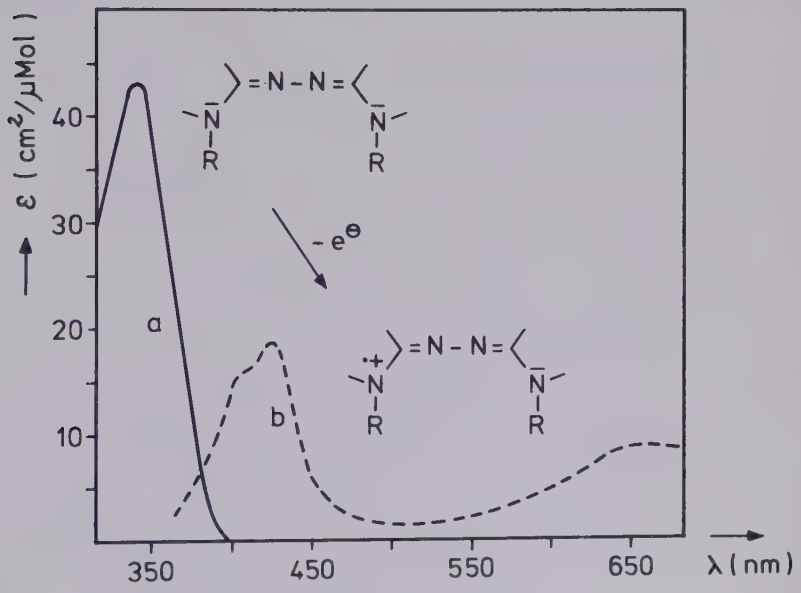


Abb. 7 Absorptionsspektren der reduzierten Stufe (a) und des Radikalkations (b) von ABTS in neutralem wäßrigen Medium (2µ Mol ABTS in o,1 M Phosphat - Puffer pH 7)

Wobei das Radikalkation eine Schulter bei 405 nm und eine wenig intensive Bande bei 650 nm ausbildet.

Die latente Disproportionierung des Radikalkations - durch Protonierung wird die Azinstufe aus dem Gleichgewicht gezogen, oder Hydroxylionen verschieben durch Reaktion mit der Azinstufe das Gleichgewicht - kann durch Erhöhung der Azinkonzentration unterdrückt werden.
Bei der Oxydation von ABTS mit Wasserstoffperoxid und POD ist bei äquivalenten Konzentrationen nach rascher Oxydation des Azins eine Sekundärreaktion offensichtlich.
Über einen isobestischen Punkt wird nach kurzer Zeit die Bande des Azins wieder aufgebaut. Nach einer 2×10^2 - fachen Konzentrationserhöhung des Azins wird diese Sekundärreaktion unterdrückt und die Extinktion im Absorptionsmaximum des Radikalkations bleibt konstant.
In der gekoppelten enzymatischen Reaktion mit GOD und POD wird ß-D-Glucose unter O_2 - Sättigung durch GOD zu δ - Gluconolacton oxydiert, das spontan zu D - Gluconsäure hydrolysiert (WERNER et al (1970)). Das dabei entstehende H_2O_2 oxydiert in Anwesenheit von POD das reduzierte Chromogen äquimolar zur umgesetzten Glucose.
Die photometrische Untersuchung der Oxidationsreaktion von ABTS mit Wasserstoffperoxid und POD erfordert eine definierte spezifische Peroxidaseaktivität.

1. 10^{-5} mM H_2O_2 /ml und 2×10^{-3} mM ABTS /ml in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 umgesetzt mit steigender POD - Konzentration (Δt = 2 min) → 0,05 U POD /ml.

Aktivitätsbestimmung über Guajacol (436 nm / 25°C / ε = 25,5 cm^2 /µM Tetraguajacol)

2. Die erforderliche GOD - Aktivität beträgt 3 U GOD /ml in o,1 M Phosphatpuffer pH 7 um $1o^{-5}$ mM D-Glucose /ml umzusetzen.
Aktivitätsbestimmung über o-Dianisidin (436 nm / 25°C / ε = 8,3 cm^2 /µM D-hydrochlorid)

Die Eichgeraden liegen für (1) mit 1 U POD /ml bei $1o^{-6}$ - 3 x $1o^{-5}$ M H_2O_2 /ml und für (2) mit 7 U GOD /ml bei $1o^{-6}$ - 3 x $1o^{-5}$ M D-Glucose /ml im Koordinatenursprung; d. h. das Lambert - Beersche - Gesetz ist erfüllt.

Testansatz

1. (5 ml) Puffer - Enzym - Chromogen - Konzentration :
o,12 M Phosphat - Puffer pH 7
1,5 U POD /ml
9 U GOD /ml
o,92 mM ABTS

2. (o,1 ml) ß-D-Glucose -Standard - Konzentration :
1,785 µg D-Glucose /ml bzw.
o,1 ml Probevolumen aus Fragmentation

Messung bei 4o5 nm, Testvolumen 5,1 ml (24°C / t = 35 min / ε = 36,8 cm^2 /µM).
Die Spezifität des ß-D-Glucose Nachweises, insbesondere mit Partner NAG war bei äquimolaren Verhältnissen bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit :

ß-D-Glucose : NAG = 1oo : o,82

2.13. DMAB - NAG - Nachweis

1. o,8 M Kaliumtetraborat ($K_2B_4O_7$) pH 7,25 - 11,5 in H_2O (eingestellt mit H_3BO_3 und KOH)

2. DMAB (p-Dimethylaminobenzaldehyd)
   o,5 M DMAB in 1oo ml Eisessig CH_3COOH / 1o N HCl
   (v / 12,5%)
3. NAG (2-Acetamido-2-deoxy-D-Glucose)
   o,o5 µM NAG / ml - o,4 µM NAG / ml in H_2O

Das Gemisch aus o,1 ml o,8 M Kaliumtetraborat + o,5 ml einer definierten Konzentration NAG wird für 3 min am Siedepunkt gehalten. Nach einer augenblicklichen Temperaturerniedrigung in flüssigem CO_2 auf 0°C wird mit 3 ml o,5 M DMAB bei 37°C für 2o min inkubiert. Die anschließend stark abgekühlten Proben (4°C) weisen ein Absorptionsmaximum bei 544 nm und 585 nm auf. Verantwortlich hierfür ist die Bildung einer intermediären Verbindung - einem Glucoxazolin -, das durch die Erhitzung aus Acetylhexosamin in alkalischem Medium entsteht, und der Reaktion dieser intermediären Stufe mit DMAB während der Farbentwicklung in saurem Medium (MEGA et al (197o)).
Die Boratkonzentration interferiert mit der Farbentwicklung, d. h. da sie ab o,8 M die Acidität stark erniedrigt und somit die Bildung des Reaktionsproduktes inhibiert.
Eine Erhöhung über o,5 M DMAB hat keinen Einfluß auf die Proportionalität von Extinktion und NAG bei Konzentrationen < o,5 µM NAG.

Bei höheren NAG - Konzentrationen als o,15 µM NAG verschiebt sich das pH - Optimum in den alkalischen Bereich um pH 9,3 .
Nahezu lineare Verhältnisse werden im Intervall von o,oo1 - o,o5 µM festgestellt (s. Abb. 8)

Testansatz

1. 3 ml 0,5 M DMAB - Lösung

2. o,1 ml o,8 M Kaliumtetraborat - Puffer - Lösung pH 8,5
3. o,5 ml Probevolumen aus Fragmentation

Messung bei 585 nm, Testvolumen 3,6 ml (37°C / t = 2o min)

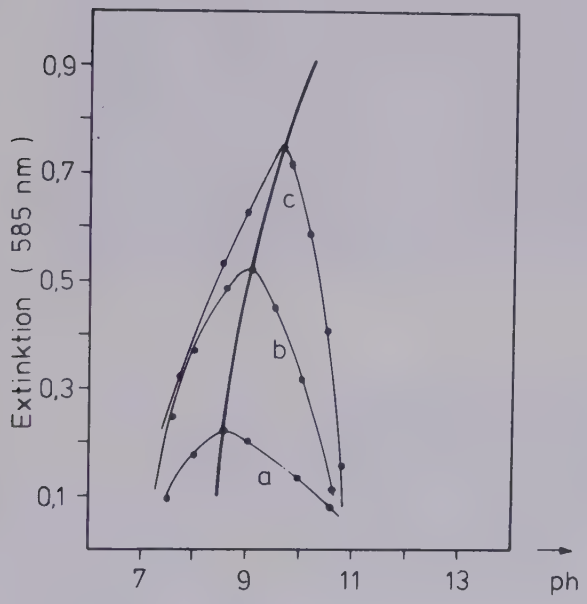


Abb. 8 pH - Abhängigkeit der Farbentwicklung über DMAB bei aufsteigenden Konzentrationen von NAG (o,o5 µM, o,1 µM und o,15 µM NAG)

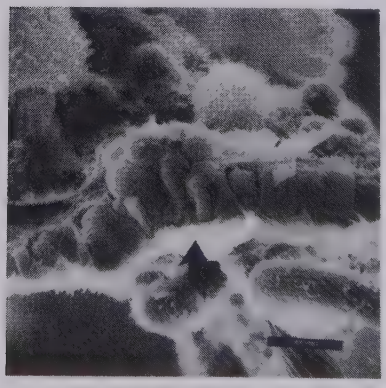
(a) (b) (c)

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Kultur des *Phycomyceten*

Die in PSHv implantierten Teile des *Prasiola* - Thallus mit ektobiotischen Zellen des *Phycomyceten* konnten sich nicht regenerieren (frühes Prasiola - Stadium). Gleichwohl bildeten die Pilzzellen eine Zellwandtextur aus, die von einem deutlichen Anulus durchzogen ist (Abb. 1o). Im 4-d-Stadium brachen die Zellen entlang dieser Einkerbung auf und entließen 8 - 12 Zoosporen (Abb. 25), die sich mit ihrem Flagellum am Nährboden anhefteten. Abbildung 12 verdeutlicht das Wachstum in statischer Kultur. Der sigmoide Verlauf

a) der synchron zur infizierten *Prasiola* - Kultur gesetzten *Phycomyceten* - Kultur und
b) der Infektionsrate in KSW auf entsprechenden Organisationsstufen der Alge, ist nahezu identisch.



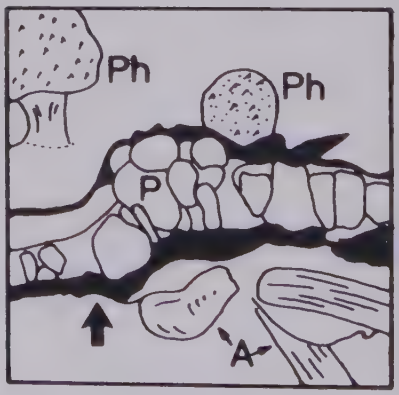


Abb. 9 Schwellbereich im Thallus der Alge mit Insertionsstelle eines Appressoriums. Pfeil = sezernierter Gallerthof. Raster 3o µm

A = Appressorien
P = *Prasiola*-Thallus-Zelle
Ph= *Phycomyceten*-Zellen in verschiedenen Stadien
Schwarz = sezernierter Gallerthof

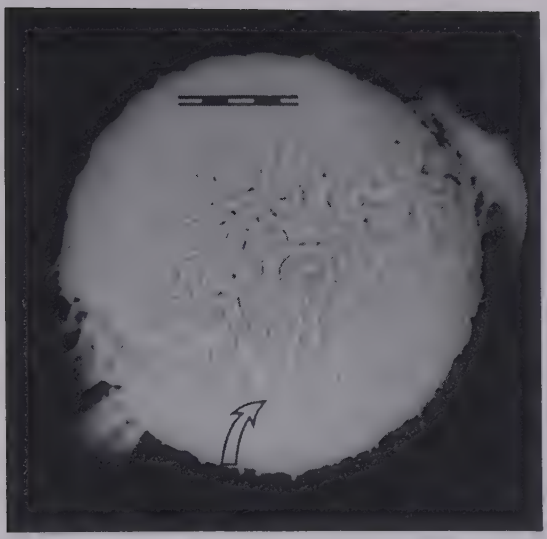


Abb. 1o 3-d-Stadium des *Phycomyceten* mit genarbter Zellwandtextur. Raster 5 µm

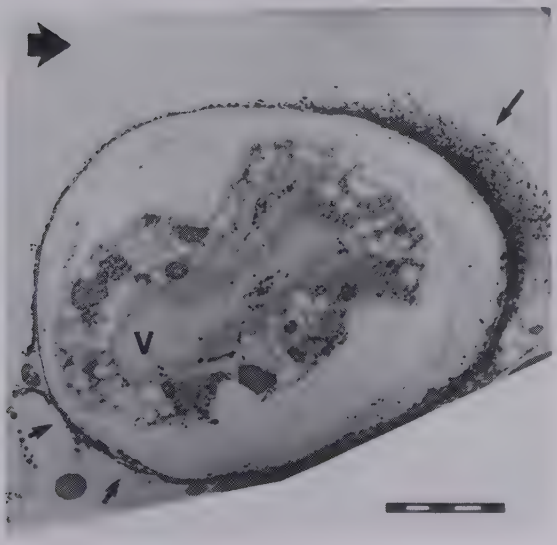


Abb. 11 3-d-Stadium mit NAG-WGA-Au-Komplexen. Pfeil= Perfusionsrichtung o.l.
V= Vakuole mit Kondensationskeimen. Raster 5 µm

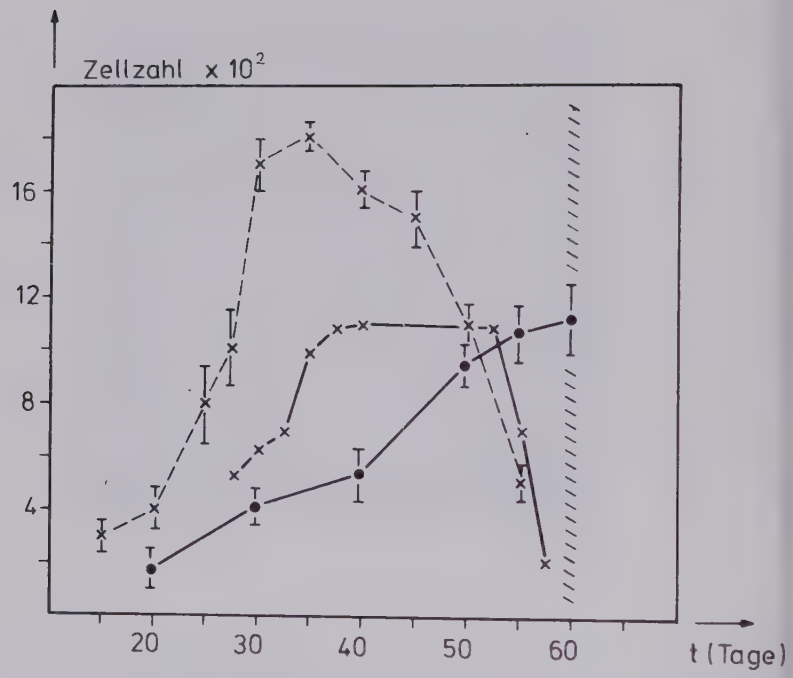


Abb. 12

●—●—● *Prasiola stipitata* - Zellzahl im 6o-d-Standard-Zyklus in BSS (Hormidium-Prasiola-Stadium) nach NaOH/Trypsin/Cellulase-Fraktionierung.

x--x--x *Phycomyceten*-Zellzahl in synchron geführten Mono-layer Kulturen. 55-d-Stadium (Letalphase) auf PSHv in BSS

x——x *Phycomyceten*-Zellzahl auf *Prasiola* in KSW (Schizogonium-Prasiola-Stadium

//////// Einsetzende marginale Sporulation.

(je 1o Aplanosporen, Phycom.-Zellen/Ansatz)

Im Vergleich der stationären Phasen fällt die isolierte *Phycomyceten* -Kultur offensichtlich schneller in die Absterbephase als die infizierten Algen - Kulturen. Das bedeutet, daß die Alge ernährungsphysiologisch konstantere Substratbedingungen aufrechterhält, was durch die Anschwellungen der Thalluszellen im basalen Bereich des vom Pilz gebildeten Appressoriums bestätigt wird (Abb. 9).
Ein weiteres Argument für diese Verbindung der beiden Organismen ist der signifikante Verlauf der *Phycomyceten*-Zellzahl-Kurve auf *Prasiola* in KSW. Hier wird deutlich, daß mit fortschreitendem Prasiola - Stadium der Alge das exponentielle Wachstum des *Phycomyceten* frühzeitiger in eine statische Phase umgelenkt wird. Korreliert man die Reduktion der extrathallösen Gallerte und die folgende marginale Sporulation mit dem Wachstum des ektobiotischen *Phycomyceten*, so muß hier eine Erschöpfung des Substrates für den Pilz angenommen werden.
Der Austausch von KSW gegen BSS bzw. BSSm konnte keine nachweisliche Veränderung im Kurvenverlauf herbeiführen.

Die Anschwellungen im Bereich der Insertionsstelle des Appressoriums können nicht als Resistenzreaktion der Alge angesehen werden (SPARROW (196o)), da mit Reduktion der Gallerte ein höherer Infektionsgrad auftreten müßte. Welche reaktionsauslösende, biochemische Einflüsse vorliegen, konnte nicht experimentell erarbeitet werden.

3.2. WGA-Au (I u. II) - Markierung

1. Au I nach FAULK u. TAYLOR (1971) ohne 1,2 - Aethandiol
   Colloidales Au I ca. 4 nm ϕ .
2. Au II nach FRENS (1973) und HORISBERGER (1976/77)
   1,2 x $1o^{-2}$ M Tetrachlorogold (III)-säure in
   o,o2 % tri - Natriumcitrat - Lsg. (1oo°C unter
   Reflux)
   Colloidales Au II ca. 13,5 nm ϕ / E_{53o} = o,3 ±o,o25
3. Einstellen der Au - Marker
   WGA dialysiert gegen 2,5 mM HCl

WGA / Au I	2 mg WGA / 1oo ml Au I
WGA / Au II	o,8 mG WGA / 1oo ml Au II

   o,15 M NaCl als Konsistenzbildner / Ansatz

   1oo ml WGA / (Au I/Au II) - Lsg. mit 1o % Übersschuß
   WGA wurde in Polypropylen - tubes zentrifugiert.
   (5°C / 55 x $1o^3$ x g Au I / 9o min ,
   5°C / 28 x $1o^3$ x g Au II / 9o min)
   Aufnahme des Pellets in 1o ml o,o5 M TRIS / (o,15 M
   NaCl)- Puffer-Lsg. pH 7,2 mit o,5 mg/ml Poly -
   äthylenglycol 2oo.
4. TEM - GA / BSSm - Fixation
5. Enzymatische Hydrolyse mit NAGase / Chitobiase
   1o ml Zell - Suspension
   25o µl 1 M Kalium - Phosphat - Puffer pH 6,3
   6oo µl (3,6 U) Chitinase (35°C / 2 h)
   25o µl (1,8 U) Chitobiase (35°C / 1 h)
6. Markierung auf WGA / Au I (25°C / 4 h)
   WGA / Au II (25°C/ 8 h)

   Waschen mit TRIS - Puffer pH 7,2
7. Postfixation mit o,1 % OsO_4 - Lsg. und Kontrastierung
   mit o,5 % TCH - Lsg. (4°C / je 1 h)

8. Dehydratation und Schnelleinbettung DEO / VCD nach MULLER et JACKS (1975).

3.3. WGA - markierte 3-d-Stadien

HORISBERGER (1977) und MOLANO (198o) belegten die Affinität von WGA für N - Acetylglucosamin an Zellwandfragmenten von Hefepilzen. Die Ultrastruktur der Zellwand kann hierbei nur annähernd rekonstruiert werden, da die Markers wohl entlang der architektonischen Elemente (Mikrofibrillen) angelagert sind, aber die Anlagerung des Lectins durch die Applikationsmethode und die lichtmikroskopische Betrachtung schwerlich topographisch auszuwerten sind.
Abweichend von MOLANO (198o) wurden keine Fragmente markiert, sondern Zellsuspensionen von 3-d-Stadien, die mit enzymatisch hydrolysierten Zellwänden in DEO / VCD eingebettet wurden.
Die von VIAN (1981) publizierte Ultracryotom - Methode, wobei sie das Lectin mit seinem korrespondierenden Marker (glycosyliertes Ferritin) auf die aufgetauten, fixierte Gefrierschnitte von Hefezellen verbringt, ist ebenfalls ein erster Versuch an unzerstörten Zellen Chitinelemente und deren Verteilung nachzuweisen.
Die sehr schwache Markierung und die starken Zertörungen in den Zellinhalten konnte durch Zwischenschaltung einer Kryoprotectans verbessert werden.
Die Labilität der *Phycomyceten*-Zellen und der hohe Wassergehalt dieser in Saline submers gehaltenen Zellen erforderte eine spezifischere Präparation.
Zellsuspensionen von 3-d-Stadien (Abb. 10) wurden nach Kapitel 2.1o. präpariert und zeigen (Abb. 11) eine deutliche, periphere Markerzone an der Zellmembran. Die seitlich abgeschwemmten NAG-WGA-Au-Komplexe resultieren aus der Perfusionsrichtung (Pfeil o.l.) und unterstreichen die enzymatische Destruktion der Zellwandelemente.

3.4. Zellwandfragmentation

1. Absaugen der Zellen vom PSHv mit auf $1o^3$ mOsmol eingestellter NaCl - Lösung in die ROSE - Perfusionskammer (ROSE ET AL (197o)).
2. Sedimentation der Zellen im Drehzylinder unter Perfusion mit 1oo mOsmol NaCl - Lösung (2oo Upm / Austauschgeschwindigkeit o,5 ml / min).
   Die Intrazellularsubstanzen und Organellen werden durch die osmolysierten Zellen und aufgebrochenen Zellwände freigesetzt und mit der Perfusionsflüssigkeit ausgeschwemmt. Mitgeführte Zell-"ghosts" werden durch 2o µm Feinfilter an PTFE - Filtern sedimentiert.

Abb. 13 Zell-"ghost" einer *Phycomyceten*-Zelle Raster 2o µm

3. Kalte Trypsinierung mit o,25 % Trypsin in o,o5 M MOPS - Puffer (4°C / pH 7,2 / 24 h)
   Nach 24 h inkubieren bei 37°C im Wasserbad (2o min)
4. Denaturierung und Fraktionierung mit 25 % Aceton.
5. Mehrfaches Spülen der Fragmente mit Aqua bidest. und Zentrifugation.

6. Reinigung der Fragmente und weitere Deproteinisierung mit einer o,5 % wässrigen Lösung Triton N 1o1 (nicht-ionisches Detergents zur Ablösung von Proteinen, die Strukturfunktionen erfüllen).
7. Mehrfache Spülvorgänge mit Dehydratation in 1oo % EtOH.

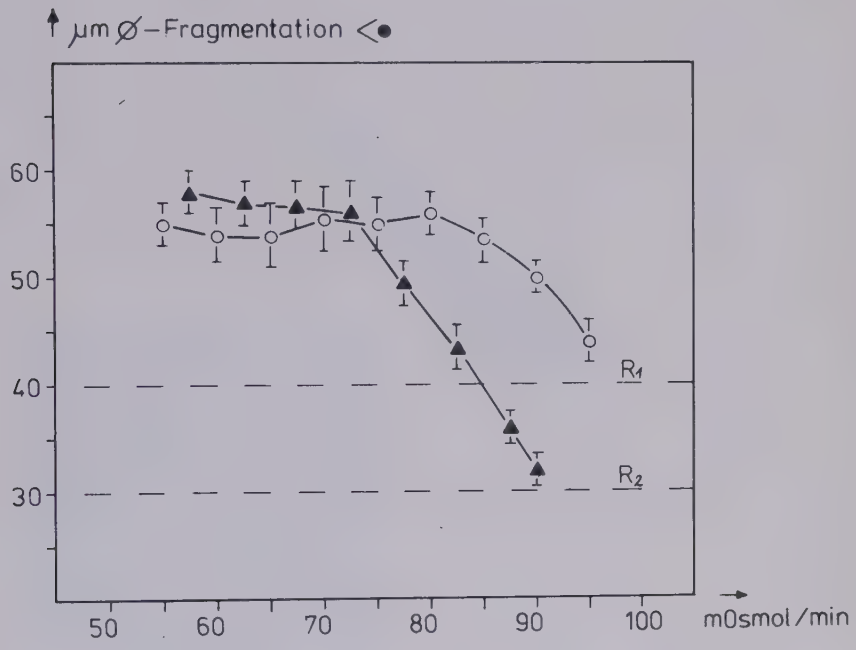


Abb. 14 Fragmentation bei Perfusion abnehmender Osmolalitäten pro min und die damit korrelierte Zellgröße bei Osmolyse.
R_1 o—o Referenz 4o µm Zellen
R_2 ▲—▲ Referenz 3o µm Zellen.

Bei ca. 7o mOsmol / min Perfusion tritt die Fragmentation bei größter Zellausdehnung ein, d. h. die aufreißenden Zellwände sind maximal gedehnt und damit die Mikrofibrillen für EM-Untersuchungen optimal auseinandergezogen.

Durch die erhöhte Osmolalität der BSS - Medien wurden Schrumpfungsartefakte bei REM- und TEM - Untersuchungen minimiert. Gleichzeitig darf angenommen werden, daß BSS und Zelle isoton eingestellt sind.

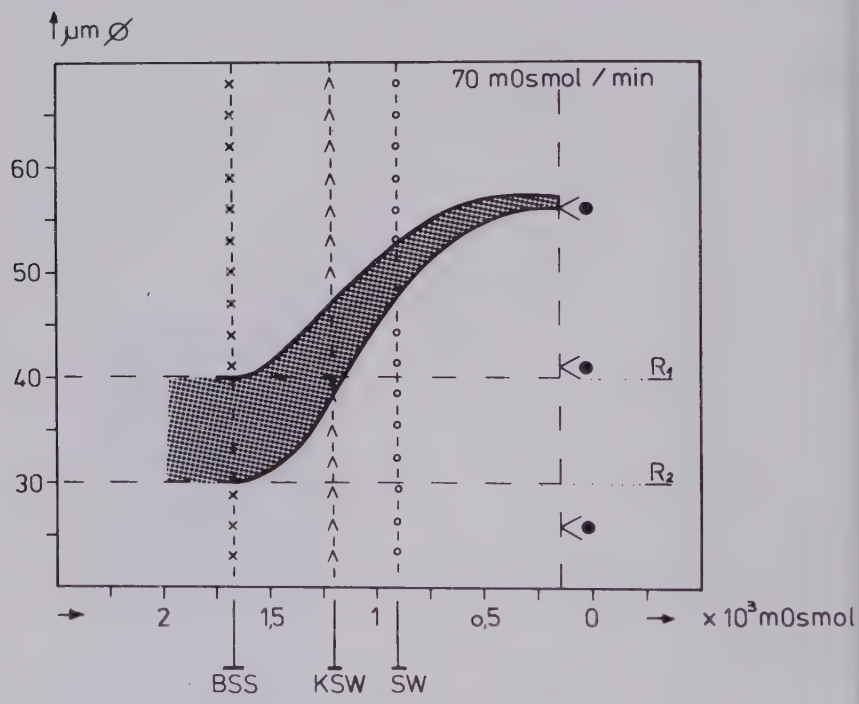


Abb. 15 Dilatation der *Phycomyceten* - Zellen.
R_1 = Referenz 4o µm - Zellen
R_2 = Referenz 3o µm - Zellen
◀● Zell-"ghosts" / Fragmentation

Die in Kapitel 3.4. erarbeiteten Zell-"ghosts" und die damit für eine weitere Behandlung erforderliche maximale Dehnung (Abb. 15) und Entzerrung der Zellwandmatrix, ermöglichte einen REM-Negativ-Abdruck, der, ergänzt durch proteinfixierte Oberflächendarstellung, ein zweischichtiges, räumliches Bild der *Phycomyceten* - Zellwand lieferte.

3.5. Rekonstruktion der Zellwand

Es lagen bisher keine Zellwanduntersuchungen bei *Phycomyceten* vor. Alle bislang untersuchten Spezies waren relativ unkompliziert zu bearbeitende Hefezellen (VIAN (1981)) und andere Ascomyceten wie *Neurospora crassa*, die HUNSLEY etBURNETT (1968/7o) bearbeitete. BARTNICKI - GARCIA (1968) untersuchte *Schizophyllum commune*, einen Basidiomyceten, mit Chitinase und leitete aufgrund der optischen Leerstellen im EM die chitinlayer in der Zellwand ab.
Die durchgeführte Fragmentation der Zellwände ergab im vorliegenden Fall in Verbindung mit Lectin-NAG gekoppelten Markierungsexperimenten ein eindeutiges, reproduzierbares Bild des Zellwandaufbaus des kultivierten *Phycomyceten* (Abb. 16 und 17).

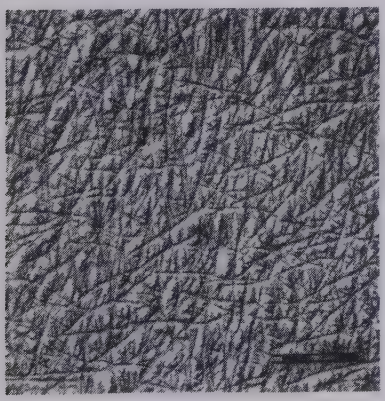
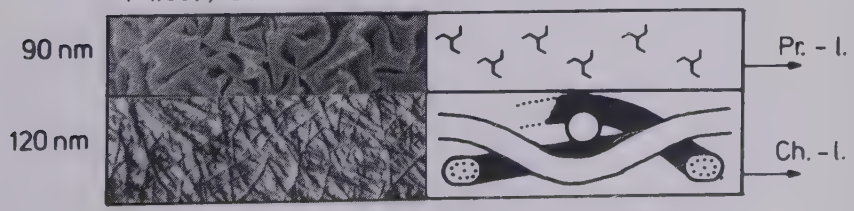


Abb. 16 Zellwandnegativ nach kalter Trypsinierung u. Tritonbehandlung. Phototechn. hochaufgelöst. Raster 1oo nm.

Abb. 17 Rekonstruktion der Zellwand. Durchschnittliche Stärke ca. 21o nm: Protein-layer 9o nm, Chitin-Mikrofibrillen-layer 12o nm. Links REM und TEM-Abb., rechts schematische Darstellung.



Nach Abbildung 17 zeigt das Zellwandnegativ nach kalter Trypsinierung eine starke Vernetzung der Mikrofibrillen, die in einer ca. 21o nm starken Proteinschicht eingebettet sind. Abb. 16 belegt in Verbindung mit den Ergebnissen aus dem DMAB - NAG - Nachweisen die Konstitution der Fibrillen und die Einschichtigkeit der Zellwand des *Phycomyceten*.
Prasiola stipitata SUHR weist nach FRIEDMANN (1959) eine zweischichtige Zellwand auf. Eine innere Individualschicht, d.h. jede einzelne Thalluszelle ist von einer abgeschossenen Zellwandschicht umgeben, und einer kollektiven Schicht die den Thallus formt, wobei diese auch zwischen den Zellen verläuft.
Abbildung 18 zeigt eine Zwischenstufe der Cellulase / Mazerozym - Präparation mit enzymatisch aufgeschlossener äußerer Zellwandschicht (37°C / 9 h).

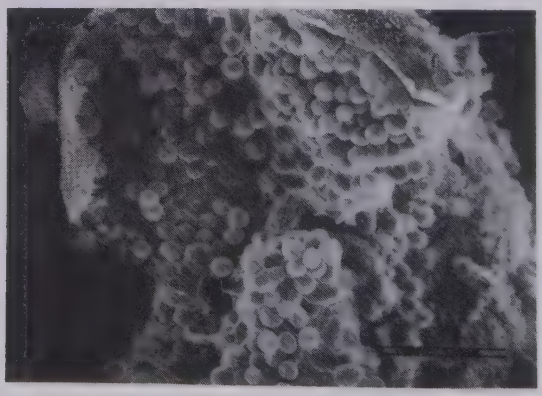


Abb. 18 Cellulase / Mazerozym - Präparation (37°C / 9 h).
Raster 2o µm.

Protoplastenkulturen von *Prasiola* - Thallus -Zellen entstehen erst nach ca. 16 stündiger Inkubation mit der Enzymlösung.

Abb. 19 Replica einer *Prasiola*-Thallus-Zelle.
1 = ES der Kernmembran mit relativ dicht gesetzten Kernporen u. Ribosomenkränzen.
Z = Zellwand. Raster 5 µm.
Pfeil = Bedampfungsrichtung.

Ein Hinweis darauf, daß die innere Zellwandschicht eine enorme Cellulosefibrillendichte aufweist und im Verhältnis zur äußeren Schicht sehr viel dicker ist (ca. 35o nm / 13o nm). Beide Systeme sind im hohen Maße mit Pectin als protein-layer imprägniert.
HERTH et al (1977) weist erstmalig an einer Chrysophycee (*Poteriochromonas stipitata (syn. Ochromonas malhamensis*)) Chitin in den Mikrofibrillen nach und eröffnet somit die Frage, ob weitere Algen außer den Chrysophyceen und Diatomeen (MC LACHLAN (1965) und BLACKWELL (1967)) Chitin als Zellwandsubstanz synthetisieren.
Bei *Prasiola stipitata* war in allen Entwicklungsstadien kein Chitin nachzuweisen (siehe DMAB - NAG - Nachweis).

Die unterschiedliche Zellwanddicke von *Prasiola* und *Phycomycet* veranschaulicht Abb. 19 und Abb. 2o, wobei die relativ schwach vernetzten Chitinmikrofibrillen leicht aus der Proteinmatrix herausgerissen werden → Z ←, während die kompakte *Prasiola* - Zellwand homogen aufbricht.
Auch wird an diesen beiden Brüchen die unterschiedliche Dichte der Kernporen offensichtlich, die die perinukleären Cysternen der Kernoberfläche durchsetzen, und mit der unterschiedlichen Kerngröße beider Zellen, die Individualität unterstreichen.

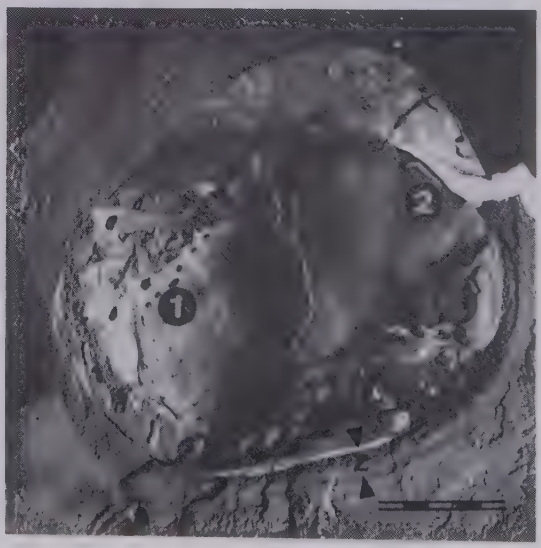


Abb. 2o Replica einer *Phycomyceten* - Zelle.
1 = ES der Kernmembran,
2 = PF der Vakuole mit inselhaften PS - Resten. Kernporen weit auseinanderliegend. Z = Zellwand. Kernporen durchsetzen die perinukleären Cysternen der Kernoberfläche. Raster 5 µm.

3.6. Aufbau der Chitin - Mikrofibrillen im Entwicklungszyklus des *Phycomyceten*.

Ausgangsmaterial für die NAG - Bestimmung waren Zellkulturen unterschiedlicher Entwicklungsstufen bei einem zeitlichen Untersuchungsintervall von 1 - 4 Tagen. Die gereinigten und deproteinisierten Zellwandfragmente von 2 x 10^3 Zellen wurden in 2 ml o,o5 M Phosphat - Puffer aufgenommen (pH 6,3) und mit 1,5 U Chitinase und 1,5 U Chitobiase im Überschuß bei 35°C inkubiert (2h). Abbruch der Reaktion und Enteiweißung durch Zugabe von 4 x 5o µl 25% Uranylacetatlösung. Jede Probe wurde halbiert und in ABTS - D - Glucose- bzw. DMAB - NAG - Nachweisreaktion verbracht.
Es konnte ausschließlich das freie Monomer N - Acetyl - glucosamin nachgewiesen werden.

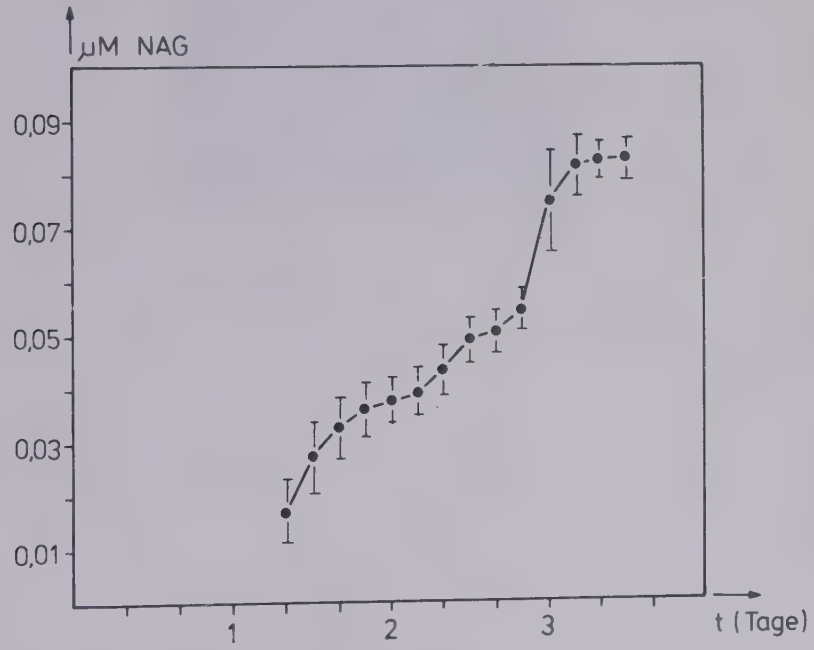


Abb. 21 NAG - Gehalt der Zellwände von *Phycomyceten* - Zellwänden unterschiedlicher Entwicklungsstufen. Untersuchungszeitraum: Applikation der Zoosporen → Sporangienentwicklung.

Zur Kontrolle wurden parallele Ansätze mit Cellulase (aus *Aspergillus niger*) gefahren, um eventuell vorhandene Verunreinigungen bei der Kulturentnahme oder verschleppte D - Glucose - Einheiten durch die Osmolyse herauszuarbeiten.
NAG - Monomere konnten frühestens nach 3o-stündiger Kultivierung nachgewiesen werden (Abb. 21).

Abb. 22 3o h - Stadium der Zellkultur auf PSHv unstabilisiert und getrocknet über CPD. Raster 5 µm.

Abbildung 22 zeigt die Reinkultur des *Phycomyceten* auf dem entwickelten Homogenat der Grünalge *Prasiola*. Durch den Wasserentzug über CPD ist das Substrat stark zerklüftet. Abbildung 24,1 zeigt den *Phycomyceten* auf stabilisierter Unterlage.

Trotz der hohen Sensibilität des Nachweises - es könnten bis 5 x $1o^{-10}$ M NAG noch nachgewiesen werden - war eine Präparation vor diesem Zeitpunkt aufgrund fehlender präparativer Möglichkeiten und Zellgröße nicht möglich.

Abbildung 21 kann dennoch so interpretiert werden, daß mit dem Zeitpunkt der Insertion der Zoospore eine anfänglich hyaline Proteinzellwand aufgebaut wird, in die nach und nach als Festigungselemente Chitin - Mikrofibrillen eingebaut werden. HUNSLEY et BURNETT (1970) konnten durch einfachen, schrittweisen Abbau der Zellwandsubstanz (enzymatisch → amorphes Glucan bei *Neurospora crassa* (Ascomycet) nach 5 Tagen den Aufbau von Chitinmikrofibrillen beobachten. Diese Analogie ist umso erstaunlicher, als es sich hier um systematisch grundverschiedene Species handelt.

3.7. Metamorphose und Entwicklungszyklus des *Phycomyceten.*

In den klonierten Pilzkulturen konnte man im Verlauf von 3 - 4 Tagen (bei definierten Wachstumsbedingungen) verschiedene Stadien wiederfinden. Nach dem Anheften der Zoospore mit Hilfe ihres Flagellums (Abb. 23 /1,2,3) entwickelte der *Phycomycet* ein Appressorium mit feinen rhizoidartigen Fortsätzen (4), die ihn im Substrat, also hier in der Gallerte von *Prasiola*, verankern. Er bildete nachweislich auf *Prasiola* kein Haustorium aus (Plasmafärbungen mit Laktophenol - Anilinblau u. EM - Kontroll - Serienschnitte). Im 2 - d - Stadium (Abb. 24,1) hebt sich die Zelle vom Substrat ab (5) und bildet im 3 - d - Stadium (Abb. 24 /2) eine dicke, genarbte Zellwand aus, die von einer ringförmigen Einkerbung (Anulus) durchzogen wird (5).
Im frühen 4 - d - Stadium (6) klappt der obere Teil der Zelle als Operculum auf und entläßt 8 - 12 Zoosporen (Abb. 25) mit opisthokont - uniflagellater Begeißelung.

Da der gesamte, wenig entwickelte "Thallus" in ein Sporangium umgebildet wird, spricht man hier von Holokarpie, die eine Eigenschaft der *Chytridiomyceten* darstellt.

Soweit wäre ein Kreislauf geschlossen und es wurden hierbei mehrere Merkmale relevant, die eine Klassifizierung und systematische Einordnung zusammen mit den bereits abgehandelten Ergebnissen zulassen. Eine schematische Darstellung der vegetativen Phase soll diesen Zyklus verdeutlichen (Abb. 23).

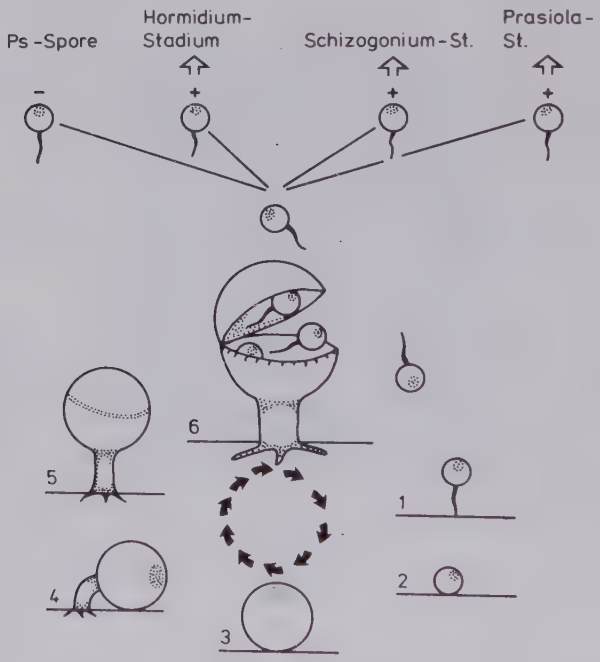


Abb. 23 Schematische Darstellung der Metamorphose von Zoospore in operculates Sporangium und mögliche Infektionslinien der Stadien von *Prasiola stipitata*.

(-) keine Reinfektion der *Prasiola*-Stadien

(+) Reinfektion möglich

(1-6) s. Text

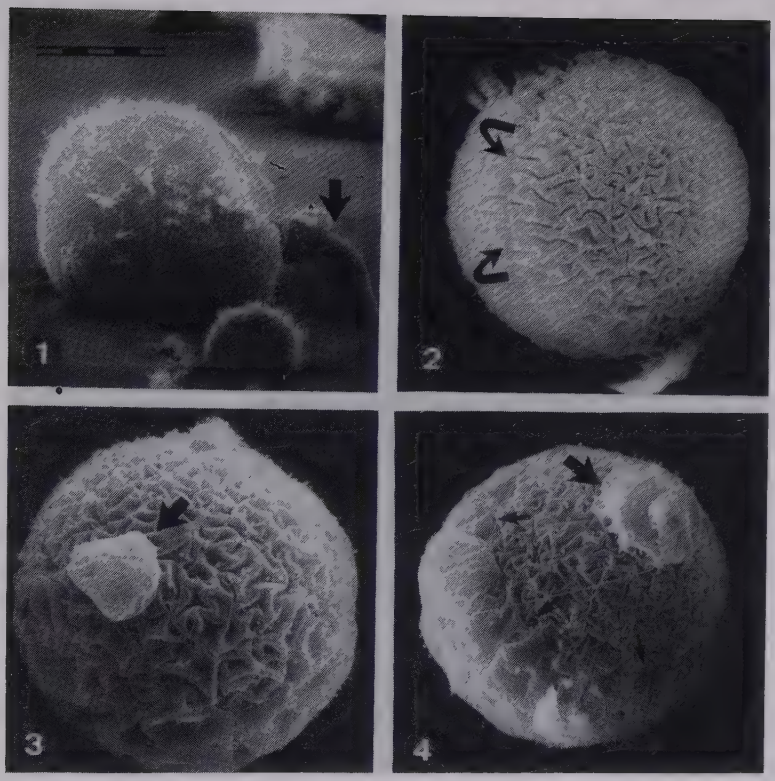


Abb. 24 / 1 2 - d - Stadium des *Phycomyceten* mit Appressorium auf PSHv mit GMA stabilisiert. Gemeinsames Raster 1o µm.

2 3 - d - Stadium mit vernarbender Zellwand (Textur) und einsetzender NAG- Mikrofibrillenbildung. Anulus als präsumptive Perforationsstelle der holokarpen Anlage.

3 4 - d - Stadium mit Bildung der Primärhyphe am Apex.

4 5 - d - Stadium mit Sekundärhyphen im äquatorialen Teil der Zelle.

Abb. 25 Replica einer Zoospore mit opisthokont - uniflagellater Begeißelung. Z = Zellwand, 1 = ES, 2 = PF, 3 = PS der Zellmembran, Pfeil = Insertion des Flagellum, Pfeil unten links = Bedampfungsrichtung. Raster o,5 µm.

Bei Veränderung der Kulturbedingungen durch Erhöhung der Inkubationstemperatur für PSHv - Exzidate oder infizierte *Prasiola* Klone (25°C →35°C) trat im 4 - d - Stadium des *Phycomyceten* folgende Veränderung ein :

1. Im 4 - d - Stadium bildet sich am Apex der Zelle eine unseptierte Primärhyphe aus (Abb. 24/3 u. 26/1).
2. Im 5 - d - Stadium bilden sich im äquatorialen Bereich (Abb. 24/4) und am Apex Sekundärhyphen aus (Abb. 26/2), die ebenfalls unseptiert in das Nährmedium und nicht in die Alge oder Substrat PSHv hineinwachsen.
3. Ab dem 6 - d - Stadium bildet sich unter Resorption der primären Zelle ein Hyphenlager aus (Abb. 26/3).

Da in statischer Kultur Teile des Substrats und des Mediums erschöpft sein könnten, wurde eine entsprechende Kultur in Perfusion gezogen. Auch hier zeigte sich bei Erhöhung der Temperatur der gleiche Effekt, sodaß eine Reaktion des *Phycomyceten* in Richtung Oberflächenvergrößerung nicht verifiziert werden kann.
Eine weitere Beobachtung der so kultivierten Linien brachte keine Veränderung im Habitus.

Abb. 26 Bildung von Primärhyphe, Sekundärhyphe und Hyphenlager unter Resorption der Ausgangszelle. Gemeinsames Raster 5 µm.

Abbildung folgende Seite

Abb. 11 Text vorhergehende Seite

3.8. Reinfektion der axenischen *Prasiola*-Kulturen.

Klone verschiedener, axenischer *Prasiola*-Kulturen wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien :

1. *Prasiola* - Aplanosporen
2. Hormidium - Stadium
3. Schizogonium - Stadium
4. Prasiola - Stadium

mit den Zoosporen des *Phycomyceten* reinfiziert. Um erste Hinweise auf die Infektionsbedingungen in der natürlichen Umgebung von *Prasiola stipitata* und eventuell zeitliche Komponenten herauszuarbeiten, wurde aus Parallelkulturen des *Phycomyceten* ein Zoosporen-"pool" angelegt.
Die einzelnen *Prasiola* - Stadien wurden in KSW und BSS geführt und in 24 stündigen Abständen mit gleichgeschalteten Zoosporen infiziert (Abb. 27/ 1,2).
In allen reinfizierten Kulturen war die *Phycomyceten*-Zellzahl dem Maximalwert aus Abbildung 12 angenähert. Die in KSW auf Schizogonium-Stadium gezogenen Pilzzellen brachten mit geringen Abweichungen den gleichen Kurvenverlauf.
Ausschließlich die auf *Prasiola* in BSSv eingebrachten *Phycomyceten* - Zellen-Kurve erreichte den Wert für PSHv nicht, liegt aber immer noch deutlich über dem KSW - Maximum (Abb. 28).
Insgesamt ist eine Reinfektion in jeden axenisch geführten *Prasiola* - Klon möglich, wobei die frühest mögliche Infektionsstelle am Zweizellstadium der Alge liegt (s. Abb. 23).
Ebenso wurden über Kreuz reinfizierte Kulturen axenischer PSCd und PSIr angelegt, die nahezu gleiche infektionsraten aufwiesen. Nur PSCd - Klone wiesen einen schlechteren Reinfektionsgrad auf, wobei Ausgangskulturen dieser

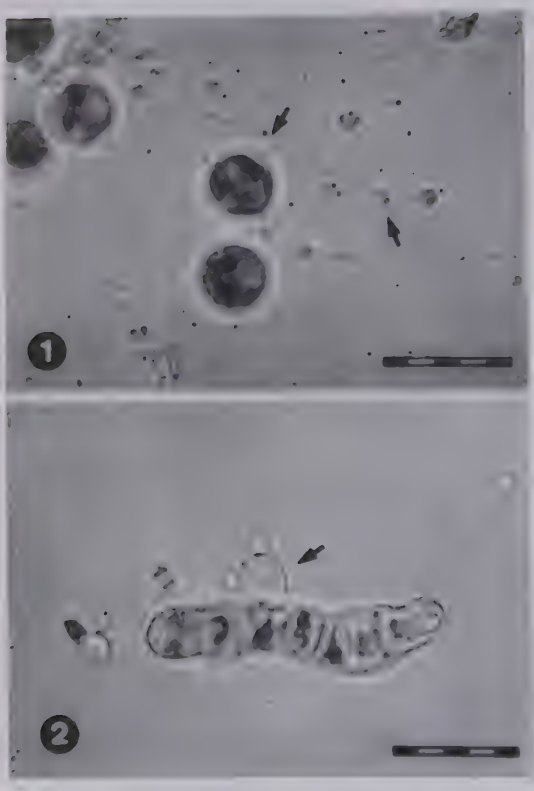


Abb. 27 1 Applikation der *Phycomyceten*-Zoospore in *Prasiola*-Aplanosporen-Kulturen. Infektion im Zweizellstadium (Pfeil) Raster 3o µm.

2 Infektion im Hormidium-Stadium. Ausbildung der hyalinen Zellblase. Raster 3o µm.

Varietät im Vergleich zu anderen *Prasiola*-Stämmen einen geringeren Infektionsgrad aufwiesen.
Alle *Prasiola*-Stämme, die axenisch gehalten wurden, wiesen vor und nach der Reinfektion den gleichen Habitus auf. Die marginale Sporulation setzte in allen Klonen etwa mit dem 6o-igsten Tag ein. *Prasiola*, submers in KSW oder BSS, zeigte in den Hauskulturen in allen Konditionierungen keine sexuelle Phase.

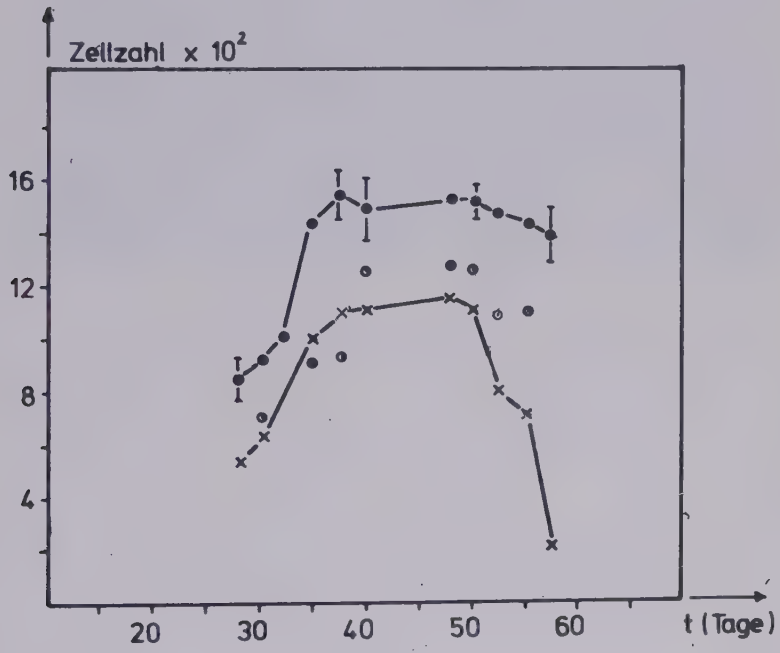


Abb. 28

x–x–x *Phycomyceten* - Zellzahl auf reinfizierter *Prasiola* in KSW.

●–●–● *Phycomyceten* - Zellzahl auf reinfizierter *Prasiola* in BSSv.

o o o *Phycomyceten* - Zellzahl auf PSHv ohne B_{12} in BSSm.

Über die Bestimmung des Trockengewichtes (s. Kapitel 2.4. und Abbildung 4), wodurch die optimale Nährstofflage gekennzeichnet wurde, konnten die axenischen und reinfizierten Algenkulturen auf mögliche Änderungen der Zellteilungsrate - und damit Zellmasse im entspechenden Zeitintervall - überprüft werden.
Es ergab sich im Vergleich der

1. Stammkulturen und Frischmaterial,
2. Axenischen Klone entsprechender Stämme

u. 3. Reinfizierten Algenkulturen

kein meßbarer Hinweis, der auf Veränderungen im gesamtheitlichen Stoffwechselhaushalt der Alge schließen läßt.
Begrenzt auf die Insertionsstelle des Appressoriums des *Phycomyceten* muß lokal zumindest von einem physiologischen Reizzustand gesprochen werden, da hier einige Zellen des einschichtigen Thallus sich abnorm vergrößern und einen dicken Gallerthof sezernieren (Abb. 9).
Auf Pellet nach CPD gebrochen, wird dieser Einfluß des *Phycomyceten* auf die infizierte Thallusstelle noch deutlicher. Abbildung 29 /1,2 zeigt den normalen, einschichtigen Thallus der Alge im Vergleich zu der Infektionsstelle, wo neuerliche Zellteilungen eine indifferente Geschwulst bilden.
Welcher biochemischer Einfluß hier vorliegt, konnte experimentell nicht geklärt werden, da eine notwendige Anreicherung dieser Zellen oder eine Untersuchung des PSHv - Substrates in diesem Bereich noch nicht möglich war.
Ein weiterführender Hinweis wäre möglicherweise die Tatsache, daß bei Entzug des Cyanocobalamins B_{12} (BSSm - Medium und PSHv - Substrat ohne B_{12}) die *Phycomyceten* - Zellzahl in entsprechenden Kulturen gegenüber den B_{12}- angereicherten Kulturen abfiel (Abb. 28). Eine eindeutige Bewertung dieses Phänomens setzt allerdings voraus, daß im Homogenat kein aktives Corrinoid vorhanden ist.

Dagegen spricht, daß *Prasiola stipitata* ausgeprägt nitrophil ist und intrazellulär Cobalamin enthalten muß.

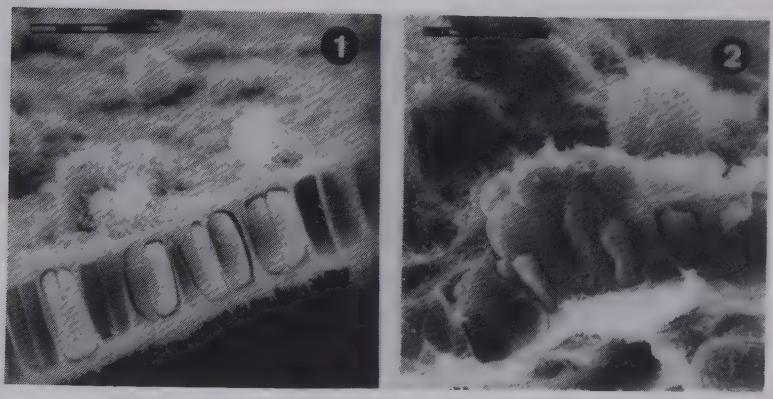


Abb. 29 1 Aufgebrochener, einschichtiger Thallus nach CPD auf Pellet.

2 Aufgebrochener Thallus an der Insertionsstelle des Appressoriums.

Gemeinsames Raster 2o µm.

4. DISKUSSION

4.1. Isolierung und präparative Verfahren

Die Isolierung von aquatischen *Phycomyceten* ist bislang bei verschiedensten limnischen Vertretern der *Phythiaceae, Saprolegniaceae* und *Blastocladiales* auf einer Vielzahl von definierten, künstlichen Substraten bekannt. Allgemein besteht bei den aquatischen *Phycomyceten* jedoch eine hohe Substrat- und Wirtsspezifität, die insbesondere bei endobiotischen Formen wie *Olpidium entophytum* in *Spirogyra communis* (Zygnemales) und *Vaucheria sp.* (Xanthphyceae), eine Isolation unmöglich erscheinen lassen.
Marine *Phycomyceten*, die opisthokont - uniflagellate Zoosporen bilden und deren einzelliger Thallus sich vollständig in ein operkulates Sporangium umbildet, sind nach SPARROW (1960) nicht isoliert worden. Wenige Vertreter der epibiotischen *Chytridiaceae* wurden auf marinen *Rhodophyceen* gefunden :

Chytridium polysiphonia auf *Polysiphonia violacea*,
Ceramium rubrum,
Delessaria sanguinea,
Chondria tenuissima.
Chytridium megastomium auf *Ceramium diaphanum*.

Bei den *Chlorophyceae* ist bisher nur *Chytridium codicula* ZELLER (Publ. Puget Sound Biol. Station,2:121,1918 in SPARROW,1960) auf *Codium mucronatum* beschrieben.

Die Isolation des untersuchten *Phycomyceten* erforderte eine Anpassung des Substrates an die Bedingungen , die der Pilz auf *Prasiola stipitata* vorfindet. Deshalb wurde in das Substrat Prasiola - Homogenat aufgenommen, da nach elektronenmikroskopischen Serienschnitten keine

Rhizoide unterhalb der Insertionsstelle in der Algenzelle zu finden waren und dennoch Reaktionen im Insertionsbereich der Alge festzustellen waren. Welche biochemischen Einflüsse zu neuerlichen Zellteilungen im einschichtigen Thallus der Grünalge und zur Bildung eines abnormen Gallerthofes führen, konnte aufgrund der notwendigen Anreicherung des Substrates nicht erarbeitet werden. Sicher ist jedoch, daß bei Corrinoid - Mangel im Substrat die *Phycomyceten* - Zellzahl gegenüber B_{12} - angereicherten Kulturen stark abfällt. Daraus läßt sich ableiten, daß vom *Phycomycet* ein biochemischer Gradient aufgebaut wird, der seitens der Alge o.g. Effekte auslöst.
Der Transfer erfolgte über Thallus - Explantate von *Prasiola* mit aufsitzenden *Phycomyceten* - Sporangien.
Die Methode des Transfers wurde gleichfalls für die rasterelektronenmikroskopische Bearbeitung herangezogen. Exzidate des *Phycomyceten* - Substrates wurden mit dem Monomer GMA infiltriert und UV - polymerisiert. Diese Präparation ist im Vergleich zu den üblichen direkten Sedimentationen (MULLER et JACKS (1975)) von Zellsuspensionen zur Critical - Point - Trocknung aus CO_2 ungleich schonender, und gewährleistet bei druckempfindlichen Einzellern eine artefaktfreie Entnahme aus dem Rezipienten.
Bisher liegen noch keine rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bei marinen *Phycomyceten* vor.
Die von GANTT (1980) empfohlene Einbettung von schwer konditionierbaren marinen Organismen für transelektronenmikroskopische Aufnahmen,konnte keine befriedigende Resultate erzielen. Die mangelhafte 3 - D - Polyaddition im Cytoplasma konnte durch Beimengungen von Partnerepoxid und Austausch der Anhydride verbessert werden.
Direkte Hinweise auf die systematische Stellung des *Phycomyceten* und die Infektion der Alge durch einen marinen Vertreter der *Chytridiaceae*, erbrachte die

Replica einer Zoospore mit uniflagellater Begeißelung und die Zellwandfragmentation. Die anschließende Bestimmung der NAG - Gehalte der Zellwände in unterschiedlichen Entwicklungsstufen und die kalte Trypsinierung der Zell-"ghosts" führen zu ersten Einblicken in den Zellwandaufbau der *Chytridiaceae*.
Die Ultracryotomtechnik von VIAN (1981), die zusammen mit einer zweischrittigen Lectin - Technik mikrofibrilläre Einheiten bei Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) nachweist, ist die Basis für enzymatische Nachweise biologischer Strukturen an ganzen Zellen.
Die vorliegende Untersuchung zeigt aufgrund einer vorgeschalteten Hydrolyse mit NAGase/Chitobiase und anschließender WGA/ Au I u. II - Markierung eine weitere Verfahrensweise zum Nachweis von Zellwandbausteinen. Hierbei wird der lokale Nachweis zugunsten eines qualitativen Nachweises verschoben. Zu untersuchen wäre, ob bei rotierender Perfusionsrichtung ein Abschwemmen der NAG-WGA-Au-Komplexe zu reduzieren ist.

4.2. Klassifizierung und systematische Stellung des *Phycomyceten*.

SPARROW (1960) und JOHNSON et SPARROW (1961) untergliedern die Klasse der *Phycomycetes* aufgrund der Begeißelung der Zoosporen in die :

Uniflagellatae	*Chytridiales*
	Hyphochytridiales
Biflagellatae	*Plasmodiophorales*
	Saprolegniales
	Peronosporales
	Lagenidiales

Die *Hyphochytridiales* zeichnen sich durch apikal - uniflagellate Schwärmer aus, während die Zoosporen der*Chytridiales* eine Schubgeißel vom Peitschentyp besitzen.
Der untersuchte *Phycomycet* bildet in seinen operkulaten Sporangien mehrere opisthokont - uniflagellate Zoosporen, die sich dem Substrat bzw. dem Wirt anheften. Zum Zeitpunkt der Encystierung der Zoospore und Bildung des Thallus werden 4 Typen relevant.

1. *Olpidium* Typ : Nach Geißelverlust Entleerung des Protoplasten in die Wirtszelle. Endobiotisch. Sporangium mit Entleerungspapille.
2. *Entophlyctis* Typ : Bildung eines Rhizoidsystems und Sporangium im Wirt. Endobiotisch, inoperkulat.
3. *Chytridium* Typ : monozentrischer Thallus auf der Wirtszelle. Sporangium operkulat. Keine Rhizoide.
4. *Rhizidium* Typ : Zoospore bildet nach Geißelverlust ausgeprägtes Rhizoidsystem, das in mehrere Wirtszellen eindringt. Epibiotisch. Sporangien operkulat.

Der *Phycomycet* läßt sich nach den vorliegenden Untersuchungen eindeutig dem *Chytridium* Typ zuordnen, wobei er nicht durch die beschriebenen marinen Arten zu identifizieren ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bis in jüngster Zeit war die Natur der blasenartigen, hyalinen Bildungen, die auf den Thalli von *Prasiola stipitata* SUHR auftreten, unbekannt. Nach 1959 versuchte FRIEDMANN sie als Reproduktionsorgane von *Prasiola* zu interpretieren.
Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß es sich bei den blasenartigen Gebilden um einen auf *Prasiola* parasitierenden *Phycomyceten* handelt, der ein operkulates Sporangium ausbildet und mehrere Zoosporen mit opisthokont - uniflagellater Begeißelung entläßt.
Die Isolierung des *Phycomyceten* und die neu entwickelten präparativen Techniken führten zu Ergebnissen, die experimentell gesicherte Aussagen über Bau, Funktion und systematische Stellung des Pilzes ermöglichen.

1. Durch enzymatischen Abbau der äußeren Zellwandschicht der *Prasiola* - Thalli konnten axenische Klone der Alge kultiviert werden. Infizierte Thallus - Explantate, die in Prasiola - Homogenat als Substrat überführt wurden, sind Ausgangspunkt einer axenischen *Phycomyceten* - Kultur. Weiterführende Experimente zeigen die Metamorphose von Zoospore in operkulates Sporangium. Die möglichen Infektionen der verschiedenen Prasiola - Stadien werden dargestellt.
2. Die Fragmentation der monozentrischen *Phycomyceten* - Zellen und eine Zell- "ghost"- Präparation ermöglichten eine konkrete Darstellung der Zellwand.
   Mit biologischen Nachweisverfahren gelang der Nachweis der Zellwandsubstanz Chitin. ABTS - ß - D - Glucose- und DMAB - NAG - Nachweis-Reaktionen belegen einerseits, die Individualität von Grünalge und *Phycomycet*, und andererseits das Phänomen der Zellwandsynthese mit fortschreitender Entwicklung der holokarpen Anlage.

3. Mit der WGA (Wheat-Germ-Agglutinin) - Au (I u. II)-Markierung und der enzymatischen Destruktion der Zellwandelemente zu NAG - WGA - Au - Komplexen ist ein wesentlicher Beitrag zur Darstellung von ganzen Zellen und der damit verbundenen lokalen Nachweisführung (hier Chitin) geleistet worden.
4. DEO - VCD - Polyaddukt - Einbettung und Kontrastierung mit Chromylchlorid erscheinen als geeignete Verfahren um marine *Phycomyceten* und osmostabile Einzeller elektronenmikroskopisch aufzuarbeiten. Diese Techniken ermöglichen eine nahezu artefaktfreie Präparation der beiden Organismen und die Feststellung, daß infizierte und axenische *Prasiola* - Thalli und enzymatisch isolierte *Prasiola* - Zellen keine Veränderungen in Habitus und Morphologie aufweisen.
5. Das Auftreten der hyalinen Zellen in allen *Prasiola*-Entwicklungsstadien konnte in klonierten und reinfizierten Algenkulturen beobachtet werden. Reinfiziert worden ist mit Zoosporen, die opisthokont - uniflagellat begeißelt sind, und in einem "pool" aus BSS (Balanced Salt Solution) gehalten werden. Diese Zoosporen weisen eine dicke chitinöse Zellwand auf und eine rückwärts gerichtete Geißel, die der Zoospore eine schnelle, ruckartige Vorwärtsbewegung vermittelt.
6. Nach Serienschnitten im Insertionsbereich des Appressoriums und Schwellbereich der Alge und elektronenmikroskopischer Kontrolle ist ein bei epi - endobiotisch lebenden, marinen *Phycomyceten* ausgeprägtes Haustorium nicht gefunden worden. In vivo vollzogene Färbungen mit dem Diachrom Oxaminblau 4 R bestätigen diesen Befund, da in Kontrollfärbungen von isolierten *Phycomyceten* - Kulturen kein Äquivalent zu finden war . D.h. der Pilz ist ein streng extramatrikal, möglicherweise interbiotisch lebender Einzeller.
7. In allen isolierten Kulturen des *Phycomyceten* konnte keine sexuelle Phase beobachtet werden (bei diesen

Vertretern allgemein wenig gefunden). Bei Erhöhung der Inkubationstemperatur bildet der *Phycomycet* unter Resorption der Ausgangszelle am Apex eine Primär - hyphe und im Anulusbereich mehrere Sekundärhyphen aus, die unseptiert und kernlos sind.

8. Der *Phycomycet* ist nach dem eingeführten Merkmalskatalog und Bestimmungsschlüssel von JOHNSON et SPARROW (1961) ein mariner *Chytridiomycet* aus der Familie *Chytridiaceae*, Gattung *Chytridium*.
   In die bisher beschriebenen Arten kann der kultivierte *Chytridiomycet* nicht eingeordnet werden. Die Gattung *Chytridium* ist bislang auf *Prasiolales* nicht beschrieben worden.
9. Für den *Chytridiomyceten* wird folgende Klassifizierung und systematische Stellung vorgeschlagen :

KLASSE *Phycomycetes*

ORDNUNG *Chytridiales*

FAMILIE *Chytridiaceae*

GATTUNG *Chytridium*

ART *Chytridium prasiolae*

Als Epitheton wird *Prasiolae* vorgeschlagen.

ART *Chytridium prasiolae*

BESCHREIBUNG DER ART *Chytridium prasiolae* :
Einzelliger, hyaliner Thallus, der extramatrikal bzw. interbiotisch als sessile, blasenförmige Zelle auf dem Substrat inseriert ist (ϕ 2o µm). Der holokarpe Thallus bildet ein operkulates Sporangium mit dicker genarbter, chitinöser Zellwand aùs, das sich durch ein subsporangiales Appressorium vom Substrat abhebt (ca. 1o µm). Operkulum durch äquatorialen Anulus begrenzt. Sporen begeißelt, opisthokont - uniflagellat (ϕ 3 µm). Hyphen, sofern vorhanden, unseptiert.
Parasitisch auf Thalli von *Prasiola stipitata* SUHR.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALEXOPOULOS, C. (1976): Introductory Mycology.-
New York 1976,
pp. 1o4 - 129

BARTNICKI - GARCIA, S. (1968): Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi.-
Annual review of Microbiology 22,
pp. 87 - 1o8

BLACKWELL, J., PARKER, K. et RUDALL, K. (1967): Chitin fibers of the diatoms Thalassiosira fluviatilis and Cyclotella cryptica.-
J. Mol. Biol. 28,
pp. 383 - 385

BRANTON, D. et al (1975): Freeze - etching nomenclature.-
Science 19o,
pp. 54 - 56

BUCHHEIM, W. (1976): Frezze - etching of dehydrated biological material.-
In: Electron microscopy 1976, Bd. II,
Ed.: Y. BEN SHAUL. Tal International Publishing Co., Tel Aviv,
pp. 122 - 124

BULLIVANT, S. et HOTCHIN, J. (196o): Chromylchlorid, a new stain for electr. micr.-
Journal Cell Biology 2o, p. 211

BURNETT, J. et TRINCI, A. (1979): Fungal walls and hyphal growth.-
British Mycological Society Symposium
London 1978,
pp. 1 - 26

CHADEFAUD, M. et EMBERGER, L. (196o): Les végétaux non vasculaire.-
Traité de Botanique I,
pp. 357 - 359

CHAPMAN, V. J. (1968): The algae.-
pp. 6o - 84

COHEN, R. (1974): Some properties of chitinase from Phycomyces blakesleanus.-
Life Science 15,
pp. 289 - 3oo

ECHLIN, P. (1978): Coating techniques for scanning electron microscopy and X-ray micro-analysis.-
In: Scanning Electron Microscopy 1978,
Bd. I, Ed.: O. JOHARI, Scanning Electron Microscopy III,
pp. 1o9 - 132

FAULK, W. et TAYLOR, G. (1973): Au immunocolloid method for the electron microscope.-
Immunochemistry 8,
pp. 1o81 - 1o83

FITZPATRICK, H. (193o): The Lower Fungi - Phycomycetes.-
New York 193o,
pp. 43 - 116

FRENS, G. (1973): Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodispers gold suspensions.-
Nature (physical Science) 241,
pp. 2o - 23

FRIEDMANN, G. (1959): Structure, life - history and sex-determination of Prasiola stipitata Suhr.-
Annals of Botany 23,
pp. 571 - 594

FRIEDMANN, G. (196o): Gametes, fertilization and zygote development in Prasiola stipitata Suhr.-
Nova Hedwigia 1,
pp. 333 - 334

FRIEDMANN, G. (1969): Life - history and morphology in Prasiola stipitata Suhr.-
In: Österr. Bot. Z. 116,
pp. 2o3 - 225

GANTT, E. (198o): Handbook of physilogical methods. Developmental and cytological methods.- Cambridge University Press, pp. 31 - 43

GOLDSTEIN, J. (1975): Affinity for N-Acetyl-Glucosamine and ologosaccharides of chitin and bacterial walls (GlcNAcß-1-4 MurNAc).- Biochim. Biophys. Acta 4o5, p. 53

HEINE, W. (1974): Vakuumprobleme bei histologischer Gewebetrocknung.- GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium 18, pp. 531 - 532

HERTH, W., KUPPEL, A. et SCHNEPF, E. (1977) : Chitinous fibrils in the lorica of the flagellate Chrysophyte poteriochromonas stipitata (syn. Ochromonas malhamensis).- Journal Cell Biology 73, pp. 311 - 321

HERTH, W. et SCHNEPF, E. (198o): The fluorochrom "Calcofluor White" binds oriented to structural Polysaccharide Fibrils.- Protoplasma 1o5, pp. 129 - 133

HORISBERGER, M. et ROSSET, J. (1976): Localization of wheat germ agglutinin receptor sites on yeast cells by scanning electron microscopy.- Experientia 32, pp. 998 - 1ooo

HORISBERGER, M. et ROSSET, J. (1977): Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy.- J. Histochem. Cytochem. 25, pp. 295 - 3o5

HORISBERGER, M. et VONLANTHEN, M. (1977): Location of mannan and chitin on the thin sections of Budding Yeast with Gold Markers.- Arch. Microbiol. 115, pp. 199 - 212

HÜNIG, S., CONRAD, H., BALLI, H. et SCHOTT, A. (1964): 2,2'-Azine aromatischer Heterocyclen und ihre höheren Oxydationsstufen.- Ann. Chem. 676, pp. 36 - 51

HUNSLEY, D. et BURNETT, J. (1968): Dimensions of microfibrillar elements in fungal walls.- Nature 218, pp. 462 - 463

HUNSLEY, D. et BURNETT, J. (197o): The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi.- Journal of General Microbiology 62, pp. 2o3 - 218

JOHNSON, T. W. et SPARROW, F. K. (1961): Fungi in oceans and estuaries.- Weinheim 1961, pp. 5o - 56

KAM, Z. (198o): The reconstruction of structure from electron micrographs of randomly oriented particles.- J. Theor. Biol. 82, pp. 15 - 39

KELLEY, R., DEKKER, R. et BLUEMINK, J. (1973): Ligand-mediated osmium binding. Its application in coating biological specimen for scanning electron microscopy.- J. Ultrastructural Res. 45, pp. 254 - 258

KOEHLER, J. (1972): The freeze - etching technique.- In: Principles and techniques of EM. Biological Applications, Bd. II, Ed.: M. A. HAYAT, New York, pp. 51 - 98

KORNMANN, P. et SAHLING, P. (1974): Prasiolales (Chlorophyta) von Helgoland.- In: Helgol. wissenschaftl. Meeresunters. 26, pp. 99 - 133

KORNMANN, P. et SAHLING, P. (1977): Meeresalgen von Helgoland: Benthische Grün-, Braun- u. Rotalgen.- In: Helgol. wissenschaftl. Meeresunters. 29, pp.1 - 289

KUSHIDA, H. (1962): A study of cellular swelling and shrinkage during fixation, dehydration and embedding in various standard media.- In: Proc. 5th Int. Congr. Electron Micr. 2, Ed.: S. BREESE, New York, p. 1o

KUSHIDA, H. (1967): A new embedding method employing D.E.R. 736 and Epon 812.- pp. 278 - 28o

LEDUC, E. et BERNHARD, W. (1967): Recent modifications of the glycol methacrylat embedding procedure.- J. Ultrastruct. Res. 19, pp. 196 - 199

LUNDBLAD, G., HEDERSTEDT, B. LIND, J. et STEBY, M. (1974): Chitinase in goat serum.- Eur. J. Biochem. 46, pp. 367 - 376

McLACHLAN, J., McINNES, A. et FALK, M. (1965): Studies on the chitan (chitin-poly-N-acetyl-glucosamin) fibers of the diatom Thalassiosira fluviatilis Hustedt. I. Production and isolation of chitan fibers.- Can. J. Bot. 43, pp. 7o7 - 713

MEGA, T., IKENAKA, T. et MATSUSHIMA, Y. (197o): Sudies on N-Acetyl-ß-Glucosaminidase of Aspergillus oryzae.- J. Biochem. 68, pp. 1o9 - 117

MOLANO, J., BOWERS, B. et CABIB, E. (198o): Distribution of chitin in the Yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study.-
Journal of Cell Biol. 85,
pp. 199 - 212

MOOR, H. (1969): Freeze - etching.-
Int. Rev. Cytol. 25,
pp. 391 - 412

MOOR, H. (1973): Cryotechnology for the structural analysis of biological material.-
Int. Rev. Cytol. 29,
pp. 211 - 235

MULLER, 1. et JACKS, T. (1975): Rapid chemical dehydration of samples for electron microscopic examinations.-
J. Histochem. Cytochem. 23,
pp. 1o7 - 11o

PETERS, T. et ASHLEY, C. (1967): An artefact in radioautography due to binding of free amino acids to tissue by fixatives.-
J. Cell Biol. 33,
pp. 53 - 6o

RAYMOND, F., SPEER, H. et KURY, W. (1963): Studies on the growth of the Red Alga Porphyridium cruentum.-
Phys. Plant 16,
pp. 636 - 643

REIMER, L. (1959): Quantitative Untersuchungen zur Massenabnahme von Einbettungsmitteln (Methacrylat, Vestopal, Araldit) unter Elektronenbeschuß.-
Z. Naturforsch. 14 B,
pp. 566 - 575

RIEMERSMA, J. (1968): Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy: A possible reaction mechanism.-
Biochim. Biophys. Acta 152,
pp. 718 - 727

ROSE, G., KUMEGAWA, M. NIKAI, H. et al (197o): The dual-rotary circumfusion system for Mark II culture chambers. I. Design, control and monitoring of the system and the cultures.-
Microvasc. Res. 2,
pp. 22 - 48

ROUND, F. et CHAPMAN, D. (1982) : Progress in phycological research.-
Elsevier Biomedical Press I,
p. 216

SAUTTER, H. (198o): Die Bläschenzellen bei Prasiola.-
Zulassungsarbeit am Institut Allg. Bot. u. Pflanzenphys. in Tübingen.

SCHILLER, A. et TAUGNER, R. (198o): Freeze-fracturing and deep-etching with the volatile cryo-protectant ethanol reveals true membrane surfaces of kidney structures.-
Cell Tissue Res. 21o,
pp. 57 - 69

SCHNEPF, E. (198o): Calcofluor White and Congo Red inhibit chitin microfibril.-
The Journal of Cell Biology 87,
pp. 442 - 45o

SELIGMAN, A. et al (1966): A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxid fixed tissue with osmiophilic thiocarbo-hydrazid (TCH).-
J. Cell Biol. 3o,
p. 424

SPARROW, F. (196o): Aquatic Phycomycetes.-
Ann Arbor 196o,
pp. 117 - 12o

SPURR, A. R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.-
J. Ultrastruct. Res. 26,
pp. 31 - 43

STEIER, K. (1976): Kegelbeschichtung mit der modifizierten Sputter-Kontrastier-Einrichtung von Leitz.-
In: Beiträge zur elektronenmikroskopischen Direktabb. von Oberfl. 9.

TAKAGI, J., SATO, T. et YAMADA, K. (1979): A rapid method for embedding fractionated samples for electron microscopy.-
J. Electron. Microsc. 28,
pp. 316 - 319

VIAN, B. (1981): The use of ultracryotomy for the study of the microfibrillar units of the cell wall.-
In: Proc. 2nd Cell wall meetings,
Ed.: D. ROBINSON, Göttingen,
pp. 153 - 161

WERNER, W., REY, H. et WIELINGER, H. (197o): Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD / POD-Methode.-
Z. Anal. Chem. 252,
pp. 224 - 228

Lebenslauf

Harald Sautter, geboren am 25. Juli 1951 in Stuttgart-Bad Cannstatt, als Sohn des Wilhelm Sautter und seiner Frau Margarete, geb. Kunert.

1958 - 1962	Grundschule Reutlingen
1962 - 1966	Realschule Reutlingen
1966 - 1971	Johannes - Kepler - Gymnasium Reutlingen
1971 - 1973	Zeitsoldat bei der Luftwaffe der Bundeswehr
1973 - 1979	Biologie- und Geographiestudium an der Eberhard - Karls - Universität in Tübingen
1979	1. Staatsexamen
1979 - 1983	Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie im Institut für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Achim Hager über das Thema : Untersuchungen zur Charakterisierung eines marinen, parasitischen Phycomyceten.
1980 - 1982	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie.
1982 - 1983	Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien.

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, Bardele, Bentrup, Blume, Drumm, Einsele, Grees, Grell, Hager, Karger, Mayer, Netzel, Oberwinkler, Rähle, Schmidt - König, Schönenberg, Schröder, Schwemmle, Seitz, Westphal, Wilhelmy.